

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 09 April 2001 (09.04.01)	
International application No. PCT/US00/21008	Applicant's or agent's file reference BB1373 PCT
International filing date (day/month/year) 28 July 2000 (28.07.00)	Priority date (day/month/year) 30 July 1999 (30.07.99)
Applicant CAHOON, Rebecca, E. et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
21 February 2001 (21.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Charlotte ENGER
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCTLTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/82, G01N 33/50, A01H 5/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/29880
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Juni 1999 (17.06.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08028		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Dezember 1998 (10.12.98)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 197 54 929.2 10. Dezember 1997 (10.12.97) DE		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 7. Oktober 1999 (07.10.99)	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST SCHERING AGREVO GMBH [DE/DE]; Miraustrasse 54, D-13509 Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMIDT, Frank [DE/DE]; Letzter Hasenpfad 8, D-60598 Frankfurt (DE). DONN, Günter [DE/DE]; Sachsenring 35, D-65619 Hofheim (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: HOECHST SCHERING AGREVO GMBH; Patent- und Lizenzabteilung, Gebäude K 801, D-65926 Frankfurt am Main (DE).			
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING TRANSGENIC PLANTS WITH MODIFIED 5-AMINOLEVULINIC ACID BIOSYNTHESIS, METHOD FOR IDENTIFYING 5-AMINOLEVULINIC ACID SYNTHESIS EFFECTORS			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG TRANSGENER PFLANZEN MIT VERÄNDERTER 5-AMINOLÄVULINSÄURE-BIOSYNTHESE UND VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON EFFEKTOREN DER 5-AMINOLÄVULINSÄURE-SYNTHESE			
(57) Abstract <p>The invention relates to a method for producing transgenic plants by means of modified 5-aminolevulinic acid biosynthesis, transgenic plant cells, transgenic plant parts, transgenic seeds, and transgenic reproduction material. The invention is characterised in that one or several nucleic acid molecules coding for a protein with a 5-aminolevulinic acid synthase function (ALAS), selected from a group of feedback regulated ALAS, animal ALAS and bacterial ALAS, an active fragment thereof or an antisense or complementary sequence thereof, are integrated into the plant genome in a stable form. Effectors of natural 5-aminolevulinic acid biosynthesis in plants are found using a method for determining effector efficacy of a test substance in relation to a GSAAT, by: a) determining the enzymatic activity of the GSAAT in the absence of a test substance b) determining the enzymatic activity of the GSAAT in the presence of a test substance; and c) by comparing the enzymatic activities determined under a) and b).</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese, transgener Pflanzenzellen, transgener Pflanzenteile, transgener Pflanzensamen, transgenen Vermehrungsguts, ist dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer 5-Aminolävulinsäure-Synthase (ALAS), ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon stabil in das pflanzliche Genom integriert werden. Effektoren der natürlichen 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese in Pflanzen werden gefunden mit einem Verfahren zur Bestimmung der effektorischen Wirkung einer Testsubstanz bezüglich der Aktivität einer GSAAT, worin man (a) die enzymatische Aktivität der GSAAT in Abwesenheit einer Testsubstanz bestimmt; (b) die enzymatische Aktivität der GSAAT in Anwesenheit einer Testsubstanz bestimmt; und (c) die unter (a) und (b) ermittelten enzymatischen Aktivitäten vergleicht.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/EP 98/08028

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 G01N33/50 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TYACKE, R.J., ET AL. : "reactions of glutamate semialdehyde aminotransferase (glutamate-1-semialdehyde 2,1 aminomutase) with vinyl and acetylenic substrate analogues analysed by rapid scanning spectrophotometry" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 309, no. pt1, 1995, pages 307-313, XP002111578	22-24, 26,27,29
Y	Abstract; Page 307, right-hand Column; Figures; Page 308 and 310, left hand Column the whole document --- -/--	25,28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 August 1999

Date of mailing of the international search report

24.08.99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

PCT/EP 98/08028

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HOOBER, J.K., ET AL. : "biosynthesis of delta-aminolevulinate in greening barley leaves. IX. structure of the substrate, mode of gabaculine inhibition, and the catalytic mechanism of gabaculine 1-semialdehyde aminotransferase" CARLSBERG RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 53, no. 1, 1988, pages 11-25, XP002111579</p>	22,24, 26,27
Y	<p>Abstract, Page 21; Fig. 10</p>	25,28
Y	<p>--- WANG, W.: "literature review on duckweed toxicity testing" ENVIRONMENTAL RESEARCH, vol. 52, no. 1, 1990, pages 7-22, XP002111580 Pages 9, 10,16; Table 4</p>	25,28
Y	<p>--- WO 97 20209 A (DU PONT ;BHIDE ARVIND KRISHNA (US); KOEPPE MARY KOLEAN (US); CASPA) 5 June 1997 (1997-06-05) Page 2; Table 1 + 2, Claims</p>	25,28
A	<p>--- ALLISON,G., ET AL.: "a suicide vector for allelic recombination involving the gene for glutamate 1-semialdehyde aminotransferase in the cyanobacterium Synechococcus PCC 7942" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 255, July 1997 (1997-07), pages 392-399, XP002100536 Abstract, Page 392, 395; Fig. 4 Page 398</p>	1-21,31, 32
A	<p>--- ZAVGORODNYAYA A ET AL: "YEAST 5-AMINOLEVULINATE SYNTHASE PROVIDES ADDITIONAL CHLOROPHYLL IN TRANSGENIC TOBACCO" PLANT JOURNAL, vol. 12, no. 1, July 1997 (1997-07), pages 169-178, XP002069810 cited in the application the whole document</p>	1-21,31, 32
A	<p>--- GOUGH, S., ETA L.: "glutamate 1-semialdehyde aminotransferase as a target for herbicides" TARGET ASSAYS MOD. HERBIC. RELAT. PHYTOTOXIC COMP. PUBLISHER: LEWIS BOCA RATON, FL.; EDITOR: BOEGER,P.; SANDMANN,G.,1993, pages 21-27, XP002100535</p>	1-21,31, 32

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/EP 98/08028

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ABELL ET AL: "biochemical approaches to herbicide discovery: advances in enzyme target identification and inhibitor design"</p> <p>WEED SCIENCE, vol. 44, 1996, pages 734-742, XP002094170 page 736, right-hand column</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-21,31, 32
A	<p>FOSTER, S. AND HOEFGEN, R.: "towards a rational design of pesticides"</p> <p>BCPC MONOGRAPH NO. 55. OPPORTUNITIES FOR MOLECULAR BIOLOGY IN CROP PRODUCTION, 1993, pages 75-81, XP002100537 page 78</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-21,31, 32
A	<p>HOEFGEN ET AL: "a visible marker for antisense mRNA expression in plants: inhibition of chlorophyll synthesis with a glutamate-1 -semialdehyde aminotransferase antisense gene"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, March 1994 (1994-03), pages 1726-1730, XP002093834 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-21,31, 32
A	<p>NEIDLE, E.L. AND KAPLAN, S.: "expression of the rhodobacter sphaeroides hemA and hemT genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes"</p> <p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 175, no. 8, April 1993 (1993-04), pages 2292-2303, XP002100547 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-21,31, 32
P,X	<p>WO 98 24920 A (GRIMM BERNHARD ;INST PFLANZENGENETIK UND KULTU (DE)) 11 June 1998 (1998-06-11)</p> <p>Abstract, Pages 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12 Claims</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,3-7, 17-20,32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ EP 98 /08028

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see annex

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08028

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9720209 A	05-06-1997	AU 1060897 A	19-06-1997
		CN 1203664 A	30-12-1998
		EP 0874985 A	04-11-1998
WO 9824920 A	11-06-1998	DE 19650216 A	10-06-1998

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: Patentansprüche 1-21,
32 vollständig; Patentanspruch 31 partiell

Verfahren zur Herstellung von herbizidresistenten Pflanzen durch Expression der 5-Aminolävulinat Synthase (ALAS) in transgenen Pflanzen.

2. Ansprüche: Patentansprüche 22-
30 vollständig; Patentanspruch 31 partiell

Verfahren zur Bestimmung der potentiellen herbiziden Wirkung einer Testsubstanz durch Messung und Vergleich der enzymatischen Aktivität der GSA-AT in Anwesenheit und Abwesenheit der Testsubstanz.

PATENT COOPERATION TREATY

JUL 19 2001

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

RECEIVED

JUL 17 2001

To:
E.I. DUPONT DE NEMOURS AND COMPANY
Legal Patent Records Center
Attn. RIZZO, Thomas M.
1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19805
UNITED STATES OF AMERICA

Date of mailing
(day/month/year) 09/07/2001 **PATENT RECORDS
CENTER**

Applicant's or agent's file reference BB1373 PCT	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US 00/ 21008	International filing date (day/month/year) 28/07/2000
Applicant E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Further action(s):** The applicant is reminded of the following:

Shortly after **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within **19 months** from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

Within **20 months** from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mireille Claudepierre

REY NOTED

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.



1

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference BB1373 PCT	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 00/ 21008	International filing date (day/month/year) 28/07/2000	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 30/07/1999
Applicant E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 7 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☒ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/21008

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-23 (partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-23 (partially)

A nucleotide sequence encoding a polypeptide of at least 25 amino acids being at least 80% identical to SEQ ID NO.18. The nucleic acid sequence of SEQ ID NO.17 being DNA or RNA. Chimeric gene comprising said nucleic acid sequences under a regulatory sequence; a host cell comprising it. A host cell comprising the first mentioned nucleic acid sequences; the host cell being yeast, bacteria or plant; a virus comprising any of the aboved mentioned nucleic acids. A polypeptide of at least 25 amino acids being at least 80% identical to SEQ ID NO.17. A method of selecting a polynucleotide that affects the level of expression of an ALA biosynthetic enzyme in a plant cell. A method of obtaining a polynucleotide encoding an ALA biosynthetic enzyme by amplification or hybridization. Composition comprising the above mentioned polynucleotide. Composition comprising the above mentioned polypeptide. A polynucleotide comprising at least 30 contiguous nucleotides of said polynucleotides. A method for selection of a cell transformed with the above mentioned chimeric gene. Said method wherein the cell is a plant; a monocot; or a dicot. A method of altering the level of expression of an ALA biosynthetic enzyme in a host cell transforming it with the above mentioned chimeric gene.

2. Claims: 1-23 (partially)

Idem as invention 1 but limited to the polypeptide of SEQ ID NO. 10, as far as it concerns to at least 25 amino acids being at least 85% identical to said sequence and the nucleic acid sequence of SEQ ID NO. 9.

3. Claims: 1-23 (partially)

Idem as invention 1 but limited to the polypeptide of SEQ ID NO. 14, as far as it concerns to at least 40 amino acids being at least 85% identical to said sequence and the nucleic acid sequence of SEQ ID NO. 13.

4. Claims: 1-23(partially)

Idem as invention 1 but limited to the polypeptide of SEQ ID NO. 28, as far as it concerns to at least 50 amino acids being at least 80% identical to said sequence and the nucleic acid sequence of SEQ ID NO. 27.

5. Claims: 1-23(partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Idem as invention 1 but limited to the polypeptides of SEQ ID NO. 24, as far as it concerns to at least 50 amino acids being at least 90% identical to said sequence, the polypeptide of SEQ ID NO. 26, as far as it concerns to at least 300 amino acids being at least 95% identical to said sequence, and the nucleic acid sequences of SEQ ID NOs.23 and 25.

6. Claims: 1-23(partially)

Idem as invention 1 but limited to the polypeptides of SEQ ID NO. 2, as far as it concerns to at least 50 amino acids being at least 95% identical to said sequence, the polypeptide of SEQ ID NO. 22, as far as it concerns to at least 240 amino acids being at least 90% identical to said sequence, the polypeptide of SEQ ID NO.4, as far as it concerns to at least 300 amino acids being at least 95% identical to said sequence, and the nucleic acid sequences of SEQ ID NOs.1,3, and 21.

7. Claims: 1-23(partially)

Idem as invention 1 but limited to the polypeptide of SEQ ID NO. 6, as far as it concerns to at least 80 amino acids being at least 95% identical to said sequence and the nucleic acid sequence of SEQ ID NO. 5.

8. Claims: 1-23 (partially)

Idem as invention 1 but limited to the polypeptide of SEQ ID NO. 16, as far as it concerns to at least 250 amino acids being at least 80% identical to said sequence and the nucleic acid sequence of SEQ ID NO. 15.

9. Claims: 1-23(partially)

Idem as invention 1 but limited to the polypeptide of SEQ ID NO. 12, as far as it concerns to at least 500 amino acids being at least 90% identical to said sequence and the nucleic acid sequence of SEQ ID NO. 11.

10. Claim : 24

A method for testing compounds capable of inhibiting an aminolevulinic acid biosynthetic enzyme, comprising the steps of transforming a host cell with a chimeric gene comprising a nucleic acid fragment encoding an aminolevulinic acid biosynthetic enzyme; allowing the host cell to express said polypeptide; treating said expressed

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

polypeptide with a compound to be tested; and comparing the activity of the said polypeptide treated with the compound to the activity of an untreated aminolevulinic acid biosynthetic enzyme polypeptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/US 00/21008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 7	C12N15/53 A61K31/713	C12N15/61 A61K38/43	C12N9/02 C12Q1/26
			C12N9/90 C12Q1/533
			C12N7/01
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)			
IPC 7 C12N A61K C12Q			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
EPO-Internal, BIOSIS, STRAND, WPI Data, MEDLINE			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
A	SANGWAN INDU ET AL: "Expression of a soybean gene encoding the tetrapyrrole-synthesis enzyme glutamyl-tRNA reductase in symbiotic root nodules." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 119, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 593-598, XP002163683 ISSN: 0032-0889 page 595; figure 2		
A	WO 99 29880 A (SCHMIDT FRANK ;DONN GUENTER (DE); HOECHST SCHERING AGREVO GMBH (DE) 17 June 1999 (1999-06-17) page 33 -page 38; examples 4-7 SEQ ID NO.6		
	-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.			
* Special categories of cited documents :			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
26 March 2001		09.07. 01	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Blanco Urgoiti, B	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/21008

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EMBL [Online] Acc. No. AB011416, 5 February 1999 (1999-02-05) NAKAYASHIKI ET AL.: "Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding glutamyl-tRNA reductase from rice" XP002163686 Sequence</p> <p>---</p>	
A	<p>JAHN D ET AL: "GLUTAMYL-TRANSFER RNA A PRECURSOR OF HEME AND CHLOROPHYLL BIOSYNTHESIS" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, vol. 17, no. 6, 1992, pages 215-218, XP000990546 ISSN: 0376-5067 cited in the application the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>SANGWAN INDU ET AL: "Expression of the soybean (Glycine max) glutamate 1-semialdehyde aminotransferase gene in symbiotic root nodules." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 102, no. 3, 1993, pages 829-834, XP002163684 ISSN: 0032-0889 page 833; figure 3</p> <p>---</p>	
A	<p>GRIMM B: "PRIMARY STRUCTURE OF A KEY ENZYME IN PLANT TETRAPYRROLE SYNTHESIS GLUTAMATE 1-SEMIALDEHYDE AMINOTRANSFERASE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 87, no. 11, 1990, pages 4169-4173, XP002163685 1990 ISSN: 0027-8424 page 4171; figure 2</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/21008

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9929880 A	17-06-1999	DE 19754929 A	17-06-1999
		AU 1966999 A	28-06-1999
		EP 1038012 A	27-09-2000


PCT

REC'D 07 NOV 2001

WIPO PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BB1373 PCT		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/US00/21008	International filing date (day/month/year) 28/07/2000	Priority date (day/month/year) 30/07/1999	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/00			
Applicant E.I.DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY et al.			
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of sheets.</p>			
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application 			
Date of submission of the demand 21/02/2001		Date of completion of this report 05.11.2001	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Page, M Telephone No. +49 89 2399 7322	



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/US00/21008

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, pages:

1-34 as originally filed

Claims, No.:

1-23 as originally filed

Drawings, sheets:

1/4-4/4 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/US00/21008

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 1-23 (partially).

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 1-23 (partially).

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N) Yes: Claims 1-23 (partially)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/US00/21008**

	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-23 (partially)
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-23 (partially)
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

III.1 A search report has only been drawn up for **claims 1-23 (partially)**, insofar as the subject matter is restricted to SEQ ID NOs. 17 and 18. See Search Report for details. According to Rule 66.1(e) EPC, it is not required that an International Preliminary Examination Report be established for subject matter which has not been searched. However, in the present application, the objections raised against inventive step apply to all 10 inventions identified by the ISA.

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

V.1 Prior Art:

D1: SANGWAN INDU ET AL: 'Expression of a soybean gene encoding the tetrapyrrole-synthesis enzyme glutamyl-tRNA reductase in symbiotic root nodules.' PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 119, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 593-598, XP002163683 ISSN: 0032-0889

V.2 Novelty - Art.33(1) and (2) PCT:

SEQ ID NOs. 17 and 18 appear to be novel in light of the cited prior art. Novelty is therefore acknowledged for **claims 1-23**.

V.3 Inventive Step - Art.33(1) and (3) PCT:

The application fails to meet the requirements of Article 34(1) and (3) EPC. The Applicants claim that they have identified SEQ ID NOs. 17 and 18 as corresponding to a fragment of soybean Glu-tRNA reductase, based on sequence comparison information. The application does not indicate what the level of sequence similarity

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/US00/21008

between SEQ ID NOs. 17 and 18 and known Glu-tRNA reductases is, nor is there any evidence provided indicating that the sequences possess the claimed function. In the absence of any information lending credibility to the claims, it is not possible to recognise any inventive step: In the absence of any functional constraints, the problem to be solved is reduced to the provision of any polynucleotide or polypeptide sequence. If, on the other hand, the problem is the provision of sequences corresponding to ALA biosynthetic enzymes (and associated products and methods) the provided subject matter has not been shown to solve the technical problem. In either case it is not possible to acknowledge inventive step.

Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese und Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der 5-Aminolävulinsäure Synthese

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese, die Verwendung von Nukleinsäuremolekülen kodierend für ein Protein mit der Funktion einer 5-Aminolävulinsäure Synthase (ALAS) zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der und die Verwendung von Effektoren der 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese, insbesondere die Verwendung von herbizid wirksamen Inhibitoren der pflanzlichen 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese in Pflanzenkulturen, vorzugsweise in transgenen Pflanzenkulturen.

Der Einsatz von Herbiziden zur Kontrolle von unerwünschtem Pflanzenwuchs auf landwirtschaftlichen Kulturflächen ist in der modernen Landwirtschaft weit verbreitet. Trotz des Einsatzes von Herbiziden ist eine effiziente Kontrolle von Unkräutern und Schadpflanzen nicht immer zufriedenstellend möglich, da hochwirksame Herbizide mit einem breiten Wirkungsspektrum oft eine Unverträglichkeit bei Nutzpflanzen aufweisen oder auch die Entstehung von Resistenzphänomenen beobachtet werden kann.

Diese Nachteile versuchte man bisher durch Nutzpflanzen zu umgehen, die gegenüber nicht selektiv wirksamen Herbiziden tolerant sind. Die Herbizidtoleranz kann erzeugt werden, indem das pflanzliche Enzym, welches durch das ausgewählte Herbizid inhibiert wird, derart verändert wird, daß es weniger empfindlich gegenüber dem herbiziden Wirkstoff ist. Beispielsweise sind in der WO 95/3459 Pflanzen beschrieben, die Gene von Varianten der Protoporphyrinogen Oxidase exprimieren und dadurch eine erhöhte Toleranz gegenüber herbiziden Diphenylethern und anderen Inhibitoren der pflanzlichen

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Protoporphyrinogen Oxidase besitzen.

Herbizidtoleranz wurde ebenfalls durch die Einführung von Enzymen auf gentechnologischem Wege in den Stoffwechsel von Kulturpflanzen erreicht, welche den applizierten herbiziden Wirkstoff deaktivieren können (z. B. EP-A-0 242 236; EP-A-0 343 100).

Es ist bekannt, daß die Biosynthese von 5-Aminolävulinsäure (ALA) ein geschwindigkeitsbestimmender und regulierender Stoffwechselschritt für die Synthese von Porphyrinen in Pflanzen, Tieren, Pilzen und Bakterien ist. Bei Pflanzen und den meisten Prokaryonten, mit Ausnahme der alpha-Gruppe der Purpurbakterien, wird ALA über den sogenannten C5-Stoffwechselweg aus Glutamat hergestellt. Der C5-Stoffwechselweg (C5-Weg) besteht aus drei Reaktionsschritten, katalysiert durch die Enzyme Glutamyl-tRNA Synthetase (EC 6.1.1.17), Glutamyl-tRNA Reduktase (EC 1.2.1.-) und Glutamat-1-semialdehyd Aminotransferase (GSAAT, EC 5.4.3.8.) und ist bei Pflanzen in den Plastiden lokalisiert.

Die GSAAT wurde aus verschiedenen Organismen isoliert und die Strukturgene des Enzyms kloniert, z. B. aus den Pflanzen *Arabidopsis thaliana*, Tabak, Gerste und Sojabohne.

Die pflanzliche GSAAT kann durch heterologe Expression ihrer cDNA rekombinant produziert werden (Berry-Lowe et al. (1992) Plant Physiol. 99:1597-1603).

Die GSAAT wird durch 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure inhibiert. Nach Applikation von 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure können die behandelten Pflanzen keine ALA und somit auch nicht mehr die Porphyrinverbindungen Chlorophyll, Häm und Sirohäm synthetisieren (Beale (1990) Plant Physiology 93:1273-1279). Solche Pflanzen entwickeln stark chlorotisches Gewebe, welches im Licht zerstört wird.

Ein alternativer Biosyntheseweg zur Herstellung von ALA existiert in Tieren, Pilzen, Hefen und den Purpurbakterien der alpha-Gruppe, z. B. *Rhodobacter sphaeroides* oder *Rhodobacter capsulatus*. Bei diesem als Shemin-Stoffwechselweg bezeichneten Syntheseweg werden Succinyl-CoA und Glycin in einem einzigen Reaktionsschritt, katalysiert durch das Enzym 5-Aminolävulinsäure Synthase (ALAS, EC 2.3.1.37.), zu ALA kondensiert (Kikuchi et al. (1958) Journal of Biological Chemistry 233:1214-1219). Bei Eukaryonten laufen die Reaktionsschritte des Shemin-Stoffwechselweges in den Mitochondrien ab.

Die ALAS wurde aus einer Vielzahl von Organismen isoliert. Das Strukturgen der ALAS wurde unter anderem auch aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, dem Menschen und der Maus isoliert.

Als erstes Enzym des Shemin Tetrapyrrol-Biosyntheseweges wurde die ALAS schon früh bezüglich ihrer Regulation auf Transkriptions- und auf Enzymaktivitäts-Ebene untersucht (Lascelles (1968) Biochem. Soc. Symp. 28:49-59, Garnick et al. (1975) Journal of Biological Chemistry 250:9215-9225). Insbesondere bei prokaryontischen 5-Aminolävulinat Synthasen wurde festgestellt, daß Häm ein wichtiger direkter feedback-Regulator der enzymatischen Aktivität ist.

Aufgabe war es, ein praxistaugliches Resistenzprinzip gegen Inhibitoren der pflanzlichen 5-Aminosäurelävulinsäure-Synthese und eine rationale, praxistaugliche Methode zum Auffinden solcher Inhibitoren bereitzustellen.

Die Einführung einer heterologen ALAS-Aktivität in Tabakpflanzen unter Verwendung der cDNA der ALAS aus *Saccharomyces cerevisiae* (Seq. ID Nr. 4) wurde bereits von Zavgorodnyaya et al. beschrieben (1997, Plant Journal 12:169-178).

Die Syntheserate von ALA in der Pflanze muß jedoch ausreichend sein, um den Bedarf an ALA für die physiologisch notwendige Porphyrinbiosynthese

sicherzustellen. Die Produktion von ALA darf jedoch andererseits nicht so hoch liegen, daß eine direkte oder indirekte Schädigung der Pflanze erfolgt. Deshalb wird der C5-Biosyntheseweg für ALA in Pflanzen reguliert.

In ähnlicher Weise muß in den transgenen Pflanzen, welche eine heterologe ALAS-Aktivität enthalten, gewährleistet sein, daß die Synthese von ALA keine schädlichen Folgen für die Pflanzen bewirkt.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß man Pflanzen herstellen kann, die resistent gegenüber herbizid wirksamen Inhibitoren des C5-Stoffwechselweges sind, z.B. gegen Inhibitoren der GSAAT, wenn man bestimmte heterologe ALAS-Gene in Nutzpflanzen substitutiv oder komplementierend exprimiert, so daß man nicht selektiv wirksame Inhibitoren des C5-Stoffwechselweges als Herbizide in besagten transgenen Nutzpflanzenkulturen einsetzen kann.

Mit der vorliegenden Erfindung wird daher ein Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese bereitgestellt, in welchen der durch ein Herbizid spezifisch inhibierte Stoffwechselweg durch eine die Hemmung komplementierende oder substituierende, heterologe Genexpression umgangen wird. Für eine geeignete Komplementierung oder Substitution werden die Pflanzen mittels eines oder mehrerer heterologer Nukleinsäuremoleküle mit einem oder mehreren zusätzlichen oder alternativen Biosyntheseschritten ausgestattet, die zu dem Endprodukt des inhibierten Stoffwechselweges führen, so daß eine Resistenz der transgenen Pflanze gegenüber dem herbizid wirksamen Inhibitor des C5-Stoffwechselweges resultiert.

In Pflanzen verläuft die Biosynthese von ALA ausschließlich über den im Chloroplasten lokalisierten C5-Weg. Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß transgene Pflanzen, welche eine heterologe ALAS-Aktivität enthalten, unabhängig von der Aktivität des C5-Weges Aminolävulinsäure für die Chlorophyll-

und Hämbiosynthese produzieren können.

Dieser alternative Stoffwechselweg verleiht den transgenen Pflanzen, die über eine ALAS-Aktivität verfügen, die erwünschte Resistenz gegenüber nichtselektiven Herbiziden, welche die Bildung der Aminolävulinsäure innerhalb des C5-Wegs inhibieren, z.B. durch Hemmung des Enzyms GSAAT, indem der durch den herbiziden Wirkstoff blockierte Stoffwechselschritt umgangen wird. Eine Resistenz mittels der heterologen ALAS-Aktivität ist in den transgenen Pflanzen ebenfalls gegenüber Inhibitoren der Glutamyl-tRNA Reduktase zu erhalten.

Erfindungsgegenstand ist daher ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, transgener Pflanzenzellen, transgener Pflanzenteile, transgener Pflanzensamen, transgenen Vermehrungsguts mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese, enthaltend ein oder mehrere funktionell aktive Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, vorzugsweise einer feedback-regulierten ALAS, besonders bevorzugt von ALAS aus Purpurbakterien, von aktiven Fragmenten daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon, die nach einem an sich bekannten Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen, Pflanzenteile, Pflanzensamen oder Vermehrungsguts stabil in das pflanzliche Genom integriert sind.

Genom im Sinne dieser Erfindung beinhaltet das gesamte Erbmaterial einer Pflanze, d.h. neben der Kern-DNA auch das genetische Material aller Organellen der pflanzlichen Zellen.

Ebenso überraschend wurde gefunden, daß man monokotyle Pflanzen, insbesondere Maispflanzen, herstellen kann, die resistent gegenüber herbizid wirksamen Inhibitoren des C5-Stoffwechselweges sind, z.B. gegen Inhibitoren der GSAAT, wenn man heterologe ALAS-Gene in diesen Nutzpflanzen substitutiv oder

komplementierend exprimiert, so daß man nicht selektiv wirksame Inhibitoren des C5-Stoffwechselweges als Herbizide in den besagten transgenen Nutzpflanzenkulturen einsetzen kann.

Dies war umso überraschender, als dem Fachmann bekannt ist, daß auf Grund der großen Unterschiede zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen sich Effekte, die in dikotylen Pflanzen beobachtet werden, im allgemeinen nicht ohne weiteres auf monokotyle Pflanzen in gleichem Maße übertragen lassen.

Ebenso Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, transgener Pflanzenzellen, transgener Pflanzensamen, transgenen Vermehrungsguts mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese, enthaltend ein oder mehrere funktionell aktive Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, vorzugsweise einer feedback-regulierten ALAS, besonders bevorzugt von ALAS aus Purpurbakterien, von aktiven Fragmenten daraus oder eine antisense oder komplementären Sequenz davon, die nach einem an sich bekannten Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen, Pflanzenteile, Pflanzensamen oder Vermehrungsguts stabil in das pflanzliche Genom integriert sind, dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze eine monokotyle Pflanze, vorzugsweise eine Maispflanze ist.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist die Verwendung mindestens eines Nukleinsäuremoleküls (NS) kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, vorzugsweise einer feedback-regulierten ALAS, besonders bevorzugt einer ALAS aus Purpurbakterien, eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese, vorzugsweise zur Expression eines Proteins mit der Funktion einer erfindungsgemäßen ALAS oder eines aktiven Fragments daraus in transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen oder auch bevorzugt zur Herstellung von transgenen

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist die Verwendung mindestens eines Nukleinsäuremoleküls (NS) kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, vorzugsweise einer feedback-regulierten ALAS, besonders bevorzugt einer ALAS aus Purpurbakterien, eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese, vorzugsweise zur Expression eines Proteins mit der Funktion einer erfindungsgemäßen ALAS oder eines aktiven Fragments daraus in transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen oder auch bevorzugt zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen, deren Expression eines Proteins mit der Funktion einer GSAAT oder eines aktiven Fragments daraus supprimiert oder inhibiert ist, dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze eine monokotyle Pflanze, vorzugsweise eine Maispflanze ist.

Für die Herstellung von transgenen Pflanzen, die in der Lage sind, mittels des Shemin-Stoffwechselweges ALA herzustellen, können verschiedene, literaturbekannte Gene kodierend für Proteine mit ALAS-Aktivität eingesetzt werden.

So sind Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit ALAS-Aktivität geeignet, die abgeleitet sind aus Aminosäuresequenzen von Proteinen mit ALAS-Aktivität oder deren Genen aus z.B. Tieren und Bakterien, oder allgemein von feedback-regulierten ALAS aus prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen oder deren aktiver Fragmente, z.B. die ALAS aus den Purpurbakterien der alpha-Gruppe wie *Rhodobacter sphaeroides*, Seq. ID Nr. 1 oder Seq. ID Nr. 2, (Neidle & Kaplan (1993) Journal of Bacteriology 175: 2292-2303) oder *Rhodobacter capsulatus*, Seq. ID Nr. 3 (Hornberger et al. (1990) Mol. Gen. Genet. 221: 371-378).

Zur heterologen Expression feedback-regulierter Enzyme mit ALAS-Aktivität in Pflanzen sind daher beispielsweise, aber nicht ausschließlich, ALAS-kodierende NS aus *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* und anderen Purpurbakterien der alpha-Gruppe geeignet.

In Mitochondrien synthetisierte ALA kann durch die in der Pflanze vorhandenen Transportsysteme in die Plastiden exportiert werden, in denen die Enzyme der sich anschließenden Tetrapyrrolbiosynthese lokalisiert sind.

PN:SDNY:IN: <WQ 0020RRNA2 1 >

aus dem Cytoplasma in Mitochondrien bewirken und während oder nach diesem Prozeß abgespalten werden.

Daher ist ein weiterer Erfindungsgegenstand ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, transgener Pflanzenzellen, transgener Pflanzenteile, transgener Pflanzensamen, transgenen Vermehrungsguts mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese enthaltend ein oder mehrere funktionell aktive Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, vorzugsweise einer feedback-regulierten ALAS, besonders bevorzugt von ALAS aus Purpurbakterien, von aktiven Fragmenten daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon, in dem besagte Nukleinsäuremoleküle unter der Kontrolle eines feedback-regulierten Promotors stehen sowie die Verwendung eines feedback-regulierten Promotors, vorzugsweise eines Promotors einer pflanzlichen GSAAT oder Glutamyl-tRNA Reduktase in einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen oder Pflanzen mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese.

Ebenso Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, transgener Pflanzenzellen, transgener Pflanzenteile, transgener Pflanzensamen, transgenen Vermehrungsguts mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese enthaltend ein oder mehrere funktionelle aktive Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, vorzugsweise einer feedback-regulierten ALAS, besonders bevorzugt von ALAS aus Purpurbakterien, von aktiven Fragmenten daraus oder eine antisense oder komplementären Sequenz davon, in dem besagte Nukleinsäuremoleküle unter der Kontrolle eines feedback-regulierten Promotors stehen sowie die Verwendung eines feedback-regulierten Promotors, vorzugsweise eines Promotors einer pflanzlichen GSAAT oder Glutamyl-tRNA Reduktase in einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen oder Pflanzen mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-

Biosynthese, dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze eine monokotyle Pflanze, vorzugsweise eine Maispflanze ist.

Zum anderen ist es besonders vorteilhaft, das erfindungsgemäße ALAS-Gen unter Kontrolle eines in Pflanzen spezifisch regulierten Promotors zu klonieren, um eine gezielte, feedback-regulierte Expression zu erreichen. Dazu eignen sich beispielsweise die Promotoren der Enzyme der pflanzlichen Porphyrinbiosynthese, vorzugsweise die Promotoren der Gene kodierend für Glutamyl-tRNA Reduktase und GSAAT, z.B. durch Verwendung von Promotorsequenzen die im Bereich von ca. 2 kb (kilobasen) langen, strangaufwärts gelegenen (in 3'-Richtung) Nukleinsäureabschnitten der kodierenden Bereiche besagter Gene liegen. Unter der Kontrolle eines dieser Promotoren kann erreicht werden, daß die NS kodierend für ein heterologes Protein mit ALAS-Aktivität ebenso wie die pflanzlichen Gene kodierend für Glutamyl-tRNA Reduktase und GSAAT nur bei einem physiologischen Bedarf an ALA exprimiert wird.

Darüber hinaus ist auch die kombinierte Verwendung einer NS kodierend für eine auf Protein- und Genexpressionsebene feedback-regulierte ALAS besonders vorteilhaft, d.h. sowohl ein ALAS-Protein zu exprimieren, das eine feedback-regulierte enzymatische Aktivität aufweist, als auch die Genexpression der feedback-regulierten ALAS unter die Kontrolle eines feedback-regulierten Promotors zu stellen.

NS kodierend für Proteine mit ALAS-Aktivität können aus tierischen, pilzlichen oder geeigneten bakteriellen Organismen isoliert oder synthetisch hergestellt werden. Die Nukleinsäuremoleküle werden vorzugsweise mittels gängiger molekularbiologischer Methoden (Ausubel et al. in "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc., ISBN 0-471-50338-X) ausgehend von DNA oder RNA aus dem jeweiligen Spenderorganismus kloniert werden. Die NS können mittels gängiger molekularbiologischer Methoden auch in vielfältiger Weise in ihrer Sequenz abgeändert, verkürzt oder erweitert werden, so daß eine Derivatisierung,

z.B. durch Mutation, Deletion, Substitution oder Insertion erfolgen kann.

Gegenstand der Erfindung sind auch nicht-natürlich vorkommende chimäre Gene, mindestens enthaltend einen für die Expression einer erfindungsgemäßen ALAS in Pflanzen geeigneten Promotor, der funktionell mit einem DNA-Molekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon fusioniert ist.

Gegenstand der Erfindung sind auch rekombinante Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, enthaltend mindestens ein erfindungsgemäßes nicht-natürlich vorkommendes chimäres Gen.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nukleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pflanzlichen Zellen gewährleisten.

Gegenstand der Erfindung sind auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem DNA-Molekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer erfindungsgemäßen ALAS oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon oder einem erfindungsgemäßen chimären Gen oder Vektor transformiert und/oder genetisch modifiziert sind, sowie Zellen, die von derart transformierten und/oder modifizierten Zellen abstammen, die ein erfindungsgemäß zu verwendendes Nukleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Gen oder Vektor enthalten.

Ebenso Gegenstand der Erfindung sind transgene Pflanzenzellen, die mit einem DANN-Moleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon oder einem erfindungsgemäßen chimären Gen oder Vektor transformiert

und/oder genetisch modifiziert sind, sowie Zellen, die von derart transformierten und/oder modifizierten Zellen abstammen, die ein erfindungsgemäß zu verwendendes Nukleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Gen oder Vektor enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze einen monokotylen Pflanze, vorzugsweise eine Maispflanze ist.

Gegenstand der Erfindung sind auch transgene Pflanzen, transgene Pflanzenzellen, transgene Pflanzenteile, transgene Pflanzensamen, transgenes Vermehrungsgut, herstellbar, d.h. erhältlich, vorzugsweise erhalten, nach einem erfindungsgemäßen Verfahren, enthaltend ein DNA-Molekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon, insbesondere Nutz- oder Zierpflanzen.

Gegenstand der Erfindung sind auch transgene Pflanzen, transgene Pflanzenzellen, transgene Pflanzenteile, transgene Pflanzensamen, transgenes Vermehrungsgut, herstellbar, d.h. erhältlich, vorzugsweise erhalten, nach einem erfindungsgemäßen Verfahren, enthaltend ein DNA-Molekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon, insbesondere Nutz- oder Zierpflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze eine monokotyle Pflanze, vorzugsweise einer Maispflanze ist.

Derartige Pflanzenzellen enthalten ein oder mehrere erfindungsgemäß zu verwendende(s) Nukleinsäuremolekül(e), wobei diese(s) vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist/sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor.

Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens ein erfindungsgemäßes chimäres Gen

enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt, oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung.

Zur Transformation von Pflanzen werden geeignete NS-Konstrukte hergestellt, die eine translatierbare Sequenz kodierend für ein Protein mit ALAS-Aktivität enthalten.

Dem in der Pflanzenbiotechnologie erfahrenen Fachmann stehen vielfältige Techniken zur Verfügung, um geeignete DNA-Konstrukte zur Expression eines heterologen Gens in Pflanzen herzustellen und Pflanzen mit diesem DNA-Konstrukt zu transformieren. Derartige DNA-Konstrukte werden bevorzugt durch Klonierung einer DNA-Sequenz kodierend für ALAS unter Kontrolle eines pflanzlichen Promotors in einem Pflanzen-Transformationsvektor hergestellt. Besonders bevorzugt sind hierfür binäre Pflanzen-Transformationsvektoren wie z. B. pBIB oder pPCV801 und deren Derivate geeignet.

Das Gen kodierend für ein Protein mit ALAS-Aktivität kann auch ohne eine DNA-Sequenz kodierend für ein N-terminales plastidäres oder mitochondriales Targetingpeptid unter Kontrolle eines in Pflanzen aktiven Promotors in das pflanzliche Genom inseriert werden, so daß das primäre Translationsprodukt direkt im Cytoplasma zum aktiven Protein exprimiert wird.

Mit einem der oben beschriebenen DNA-Konstrukte, welches zur funktionellen Expression eines Gens kodierend für ein Protein mit ALAS-Aktivität in Pflanzen geeignet ist, werden Pflanzenzellen oder Plastiden transformiert. Bevorzugt wird dazu eine der gängigen gentechnologischen Methoden zur Transformation von Pflanzen (beispielsweise Potrykus & Spangenberg (Eds.) "Gene Transfer to Plants" (1995) Springer-Verlag ISBN 3-540 58406-4) oder Plastiden (beispielsweise Zoubenko et al. (1994) Nucleic Acids Research 22:3819-1824) eingesetzt.

Ebenfalls ein Erfindungsgegenstand ist daher ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, transgener Pflanzenzellen, transgener Pflanzenteile, transgener Pflanzensamen, transgenen Vermehrungsguts mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese enthaltend ein oder mehrere funktionell aktive Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, vorzugsweise einer feedback-regulierten ALAS, besonders bevorzugt von ALAS aus Purpurbakterien, von aktiven Fragmenten daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon, in dem besagte Nukleinsäuremoleküle durch Plastidentransformation stabil in das pflanzliche Plastom integriert werden.

Ebenfalls ein Erfindungsgegenstand ist daher ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, transgener Pflanzenzellen, transgener Pflanzenteile, transgener Pflanzensamen, transgenen Vermehrungsguts mit veränderter 5-Aminolävulinsäure-Biosynthese enthaltend ein oder mehrere funktionell aktive Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, besonders bevorzugt von ALAS aus Purpurbakterien, von aktiven Fragmenten daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon, in dem besagte Nukleinsäuremoleküle durch Plastidentransformation stabil in das pflanzliche Plastom integriert werden, dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze eine monokotyle Pflanze, vorzugsweise eine Maispflanze ist.

Als Empfänger-Pflanzen für ein heterologes Gen kodierend für ein Protein mit ALAS-Aktivität kommen alle landwirtschaftlich wichtigen monokotylen und dikotylen, vorzugsweise monokotylen Kulturpflanzen in Betracht, in denen herbizide Inhibitoren des C5-Stoffwechselweges zur Kontrolle unerwünschter Begleitvegetation eingesetzt werden können, vorzugsweise Mais und andere Getreide, wie beispielsweise Weizen, Roggen, Gerste, Hirse und Reis sowie Baumwolle, Tabak, Zuckerrüben, Zuckerrohr, Kartoffeln, Raps, Sonnenblumen, Sojabohnen, Gemüse und Obst.

Bei der Expression der erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment zu erreichen, kann die kodierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutz- oder Zierpflanzen wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Reis, Mais), Obst- und Gemüsearten, Maniok, Kartoffel, Soja, Zuckerrübe etc..

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge und Stecklinge.

Zur Expression der erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuremoleküle in sense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine sink-spezifische Expression (z.B. Kartoffelknollen, Rüben, Tomatenfrucht) oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451), alle in Plastiden konstitutiv aktiven Promotoren, z.B. die Expressions-Signalsequenzen der *psbA*-Kassette (Staub & Maliga (1993) EMBO Journal 12: 601-606; Zoubenko et al. (1994) Nucleic Acids Research 22:3819-3824) und der *Prrn* Promotor (Svab & Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 913-917), oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais. Ferner kann eine Terminationsequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind im allgemeinen beliebig austauschbar.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-

Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, das Einbringen von DNA mittels der biolistischen Methode etc..

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. PUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren

können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid enthalten, das eine vir-Region trägt. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig; zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist ausführlich in EP 120 516 beschrieben; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic

plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes, die elektrisch oder chemisch induzierte DNA-Aufnahme in Protoplasten, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion von DNA in Mikrosporen und Pro-Embryonen, die DNA-Aufnahme durch keimenden Pollen und die DNA-Aufnahme in Embryonen durch Quellung (zur Übersicht: Potrykus, *Physiol. Plant* (1990), 269 - 273).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 491-506; Hiei et al., *Plant J.* 6 (1994), 271-282; Bytebier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 5345 - 5349; Raineri et al., *Bio/Technology* 8 (1990), 33 - 38; Gould et al., *Plant Physiol.* 95 (1991), 426 - 434; Mooney et al., *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.* 25 (1991), 209 - 218; Li et al., *Plant Mol. Biol.* 20 (1992), 1037 - 1048).

Drei der oben genannten Transformationssysteme konnten in der Vergangenheit für verschiedene Getreide etabliert werden: die Elektroporation von Gewebe, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikel-Beschluß in regenerierbare Gewebe und Zellen (Jähne et al., *Euphytica* 85 (1995), 35 - 44).

Die Transformation von Weizen wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (zur Übersicht: Maheshwari et al., *Critical Reviews in Plant Science* 14 (2) (1995), 149 - 178), vgl. auch Hess et al. (*Plant Sci.* 72 (1990), 233), Vasil et al. (*Bio/Technology* 10 (1992), 667 - 674), Weeks et al. (*Plant Physiol.* 102 (1993), 1077 - 1084) sowie Becker et al. (*Plant J.* 5(2) (1994), 299 - 307).

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid, wie Phosphinothricin, oder einem Antibiotikum, wie Kanamycin, G 418, Bleomycin oder Hygromycin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten. Erfindungsgemäße transformierte Zellen enthalten inhärent einen Marker gegenüber Inhibitoren der GSAAT.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden:

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Eine praktische Nutzung der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen kann in Verbindung mit einem Herbizid erfolgen, dessen Wirkmechanismus, zumindest teilweise, auf einer Inhibition der GSAAT und damit des C5-Weges beruht.

Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein Verfahren zum Bekämpfen von unerwünschtem Pflanzenwuchs in Nutzpflanzenkulturen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nutzpflanze einsetzt, die in oder mehrere

Nukleinsäuremoleküle, kodierend für ein Protein einer erfindungsgemäßen ALAS, aufweist und auf den Ort dieser Pflanze, die Pflanze selbst oder deren Vermehrungsgut ein herbizides Mittel aufbringt, dessen Wirkmechanismus zumindest teilweise auf einer, vorzugsweise spezifischen, Inhibition der GSAAT beruht.

Die rationale Entwicklung solcher Herbizide ist ebenso Gegenstand der Erfindung.

Es wurde gefunden, daß man herbizide Inhibitoren des pflanzlichen C5-Weges finden kann, wenn man den Einfluß einer chemischen Verbindungen auf die Aktivität der pflanzlichen GSAAT bestimmt und in Einzel- oder Reihenuntersuchungen chemisch diverse Verbindungen durchmustert. Durch Automatisierung eines geeigneten GSAAT-Aktivitätstests läßt sich auf diese Weise eine große Anzahl von Verbindungen untersuchen und das Verfahren damit praxistauglich gestalten.

Erfindungsgegenstand ist daher auch ein, vorzugsweise automatisiertes, Verfahren zur Bestimmung der effektorischen Wirkung einer Testsubstanz bezüglich der Aktivität einer GSAAT, worin man

- a) die enzymatische Aktivität der GSAAT in Abwesenheit einer Testsubstanz bestimmt;
- b) die enzymatische Aktivität der GSAAT in Anwesenheit einer Testsubstanz bestimmt; und
- c) die unter a) und b) ermittelten enzymatischen Aktivitäten vergleicht.

Das Verfahren ist geeignet, spezifische Inhibitoren oder Aktivatoren (d.h. Effektoren) der enzymatischen Aktivität der GSAAT aufzufinden, so daß u.a. Stoffe identifiziert werden können, welche eine potentielle herbizide bzw. wachstumshemmende, aber auch wachstumsfördernde Wirkung besitzen. Die zu untersuchende chemische Verbindung wird dabei bevorzugt in Konzentrationen zwischen 10^{-9} M und 10^{-3} M, und besonders bevorzugt in Konzentrationen zwischen

10^{-7} M und 10^{-4} M eingesetzt.

Die Quantifizierung der Enzyminhibition oder Enzymaktivierung (d.h. der effektorischen Wirkung) kann durch einen einfachen Vergleich der katalytischen Aktivität der GSAAT in Abwesenheit und in Anwesenheit der zu untersuchenden Testsubstanz unter ansonsten identischen Testbedingungen in einer dem Fachmann bekannten Weise geschehen.

Zur Bestimmung der Aktivität der GSAAT können verschiedene biochemische Meß-Methoden eingesetzt werden, durch die entweder die Entstehung der Reaktionsprodukte der von der GSAAT katalysierten Reaktion, z. B. ALA, oder aber eine Abnahme der Konzentration der Enzymsubstrate wie Glutamatsemialdehyd gemessen werden, z.B. durch eine Endpunktsbestimmung oder nach enzymatischer Umsetzung der Substrate, die gegebenenfalls radioaktiv markiert oder mit anderen gängigen Markern versehen waren oder durch nachgeschaltete Reaktionen nachgewiesen werden können, z.B. durch gekoppelte enzymatische Reaktionen.

Dem in der Durchführung von Enzymtests erfahrenen Fachmann stehen hierfür viele Standardmethoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten zur Verfügung (s. z. B. Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse, Band 1 und 2, Verlag Chemie, Weinheim (1974), Suelter, C.H., Experimentelle Enzymologie: Grundlagen für die Laborpraxis, Fischer Stuttgart (1990)).

Die erfindungsgemäßen Verfahren zur Bestimmung der effektorischen Wirkung von Testsubstanzen können mit gereinigter GSAAT durchgeführt werden, aber auch mit ganzen Zellen eines rekombinanten Organismus, welcher die GSAAT rekombinant exprimiert, mit GSAAT-haltigen Extrakten aus diesem Organismus oder angereicherten GSAAT-haltigen Fraktionen aus diesem Organismus. Als bevorzugter rekombinanter Wirtsorganismus seien Bakterien-, Insekten- und Hefezellen genannt. Alternativ kann auch eine aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellkulturen isolierte GSAAT verwendet werden.

Erfindungsgegenstand ist daher auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens sowie die Verwendung eines, vorzugsweise rekombinant hergestellten, Proteins mit der Funktion einer GSAAT zur Identifizierung von Effektoren der GSAAT, vorzugsweise in einem automatisierten Verfahren, z.B. in einem sog. Highthrouput screening, dessen Durchführung die Automatisierbarkeit des Verfahrens zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms zur Voraussetzung hat.

Erfindungsgemäße bzw. erfindungsgemäß identifizierte Effektoren, vorzugsweise Inhibitoren, beeinflussen (inhibieren) die Aktivität des Enzyms, vorzugsweise unter den beschriebenen Testbedingungen, vorzugsweise um mindestens 30 %, besonders bevorzugt um mindestens 50 %.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind daher mittels der erfindungsgemäßen Verfahren identifizierbare Effektoren, d.h. Aktivatoren oder Inhibitoren der enzymatischen Aktivität der GSAAT, insbesondere pestizid oder herbizid wirksame Effektoren der pflanzlichen GSAAT, speziell Strukturanaloge des Glutamatsemialdehyds, Glutamats oder des 5-Aminolävulinats sowie deren Verwendung als Pestizide oder Herbizide.

Bislang waren neben 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure nur extrem unselektive Inhibitoren der GSAAT bekannt, wie beispielsweise Aminooxyessigsäure. Die bekannten Inhibitoren sind nicht als Herbizide einsetzbar, da sie eine nicht nur für Pflanzen hohe Toxizität aufweisen. Erst die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren des pflanzlichen C5-Stoffwechselweges für 5-Aminolevulinsäure, welche als Herbizide in der Landwirtschaft eingesetzt werden können, läßt die Herstellung transgener Kulturpflanzen mit Resistenz gegenüber Inhibitoren des C5-Weges vorteilhaft und ökonomisch sinnvoll erscheinen.

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der GSAAT stehen eine Reihe von geeigneten Verfahren zur Verfügung, bei denen man eine GSAAT in einem

geeigneten Reaktionspuffer unter geeigneten Reaktionsbedingungen bezüglich Reaktionstemperatur und pH-Wert mit einem geeigneten Substrat, wie z. B. Glutamat-1-Semialdehyd (GSA), inkubiert. Bevorzugt wird zur Identifikation wirksamer Enzyminhibitoren dabei die GSAAT aus Pflanzen verwendet, besonders bevorzugt die GSAAT aus *Arabidopsis thaliana* (Seq. ID Nr. 5) oder *Hordeum vulgare* (Seq. ID Nr. 6). Die GSAAT kann in einer dem Fachmann bekannten Weise entweder aus den entsprechenden Pflanzen isoliert werden oder auch ausgehend von literaturbekannter cDNA rekombinant in transgenen Wirtszellen produziert werden.

Anstelle von Glutamat-1-Semialdehyd können als Substrate auch andere Verbindungen, wie z. B. 4,5-Diaminovaleriansäure, 4,5-Dioxovaleriansäure und insbesondere Mischungen dieser Verbindungen, verwendet werden. Die enzymatische Reaktion kann dabei durch Zusatz von Pyridoxalphosphat oder Pyridoxaminphosphat beeinflusst werden.

Eine besonders geeignete, beispielhafte Ausführungsform des GSAAT-Aktivitätstests ist im folgenden dargestellt, die insbesondere auch für eine automatisierte Ausführung des GSAAT-Tests vorteilhaft ist:

Glutamat-1-Semialdehyd kann in einem Reaktionspuffer im pH-Bereich von pH 6 bis pH 8 von einem Enzym mit GSAAT-Aktivität zu 5-Aminolevulinsäure umgesetzt werden. Die 5-Aminolevulinsäure kann dann mittels zweier Derivatisierungsschritte nachgewiesen werden. Zunächst wird dazu der Lösung eine Verbindung der allgemeinen Formel $R-CO-CH_2-CO-R'$, wie beispielsweise Acetylaceton, Acetessigsäure, Amide und Salze der Acetessigsäure, Acetessigsäureester (Methylester, Ethylester, Isopropylester, u.a.) oder Derivate dieser Verbindungen, in mindestens zehnfachem molarem Überschuß zu der erwarteten Menge an 5-Aminolevulinsäure zugesetzt. Die Mischung wird dann beispielsweise für einige Minuten erhitzt (80 °C bis Siedepunkt der Mischung) oder für 15 min oder länger bei 12 °C bis 80 °C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit findet eine Kondensationsreaktion zwischen der Aminolevulinsäure und der zugesetzten Verbindung unter Ausbildung eines Pyrrolderivates statt. Anschließend wird die Konzentration des Pyrrolderivates beispielsweise durch Zugabe von Ehrlichs

Reagenz (beispielsweise 1 Volumen) bestimmt. Bei dieser Detektionsmethode bildet das Pyrrolderivat mit dem 4-Diaminobenzaldehyd in Ehrlichs Reagenz einen farbigen Komplex, dessen Konzentration photometrisch durch eine Absorptionsmessung bestimmt werden kann. Eine geeignete Wellenlänge zur Absorptionsbestimmung liegt z. B. zwischen 530 und 550 nm. Die enzymatisch gebildete Menge an 5-Aminolevulinsäure kann anhand einer Eichreihe mit 5-Aminolevulinsäure-Lösungen bekannter Konzentrationen, welche in gleicher Weise derivatisiert werden, errechnet werden.

Die geeigneten Zusammensetzungen der Reagenzien oder die Konzentrationen von Salzen, Substraten und Proteinen, die pH-Werte, die Temperaturen, die Ansatzvolumina und die Wellenlängen zur Messung oder bei der Detektion können dabei in weiten Bereichen variieren.

Mittels eines GSAAT-Aktivitätstests kann ein Fachmann auf vielfältige, bekannte Weise die effektorischen, d.h. aktivatorischen oder inhibitorischen Eigenschaften chemischer Verbindungen auf die Aktivität der GSAAT bestimmen.

Zur Überprüfung der Wirkung eines GSAAT Inhibitors auf Pflanzen in vivo stehen dem Fachmann vielfältige Methoden zur Verfügung. Die zu untersuchenden Substanzen (z.B. definierte chemische Verbindungen, aber auch heterogene Stoffgemische) werden Pflanzen appliziert, wobei verschiedenste Hilfsstoffe, wie beispielsweise Netzmittel oder Lösungsmittel, verwendet werden können. Nach der Applikation der zu untersuchenden Substanzen werden die Pflanzen bonitiert. Substanzen, welche eine Pflanze durch selektive Inhibition der GSAAT oder des C5-Stoffwechselweges schädigen, rufen mindestens ein charakteristisches Symptom hervor. Häufig entstehen nach Applikation Chlorosen, die bei dem neugebildeten Gewebe besonders ausgeprägt sein können, und die beispielsweise durch Lichteinwirkung in Nekrosen übergehen können. Weitere Symptome können eine Depression des Wachstums oder auch ein sehr rasches Absterben der Pflanze sein. Die Symptome variieren je nach Pflanzenspezies in Abhängigkeit von deren unterschiedlicher Empfindlichkeit und in Abhängigkeit der Eigenschaften des Inhibitors.

Eine einfachen und praxistaugliche Möglichkeit für einen in-vivo Test stellt der in Beispiel 8 beschriebene Lemna-Test dar.

Die Kombination des erfindungsgemäßen in-vitro Enzymtests mit einem in-vivo-Test, vorzugsweise einer Lemna-Test, besonders bevorzugt im wesentlichen unter den in Beispiele 8 genannten Bedingungen, wobei der Konzentrationsbereich der Testsubstanz vorzugsweise im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-4} stellt eine rationale Methode zur Entwicklung von Herbiziden, deren Wirkung auf einer Inhibierung der pflanzliche GSAAT beruht, dar.

Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein Verfahren zum Auffinden herbizider Wirkstoffe, dadurch gekennzeichnet, daß man die zu untersuchende Testsubstanz wie oben beschrieben auf eine effektorische Wirkung gegenüber GSAAT testet und vorzugsweise ebenfalls einem Lemna-Test unterzieht.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer Verbindung, die in den beschriebenen Testverfahren auf Effektoreigenschaften gegenüber GSAAT, eine mindestens 30-%ige, bevorzugt mindestens 50-%ige, Inhibitorwirkung aufweist und, vorzugsweise im Lemna-Test aktiv ist, als Herbizid.

Aktiv bedeutet vorzugsweise des Auftretens von chlorotischen Gewebe, besonders bevorzugt das Auftreten vor chlorotischen Gewebe und einer Wachstumsdepression der Pflanze, vorzugsweise innerhalb von zehn, besonders bevorzugt innerhalb von sieben Tagen.

Ebenso Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschten Pflanzenwuchs in Nutzpflanzenkulturen, dadurch gekennzeichnet, daß man auf den Ort der Nutzpflanze, die Nutzpflanze oder deren Vermehrungsgut ein herbizides Mittel aufbringt, enthaltend eine Verbindung, die in der oben beschriebenen Testverfahren in einem Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-4} molar eine mindestens 30-%ige, bevorzugt mindestens 50-%ige, Inhibitorwirkung

gegenüber GSAAT aufweist und, vorzugsweise, im Lemna-Test aktiv ist.

Die Nutzpflanzen sind vorzugsweise erfindungsgemäße transgene Pflanzen mit veränderten 5-Lävulinsäure Biosynthese.

Auf den Inhalt der deutschen Patentanmeldung 197 54 929.2, deren Priorität diese Anmeldung beansprucht, sowie auf die Zusammenfassung dieser Anmeldung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen, sie gelten durch Zitat als Bestandteil dieser Beschreibung.

Die nachfolgenden Beispiele sollen der näheren Erläuterung der Erfindung dienen und bedeuten in keiner Weise eine Einschränkung.

Beispiel 1:

Konstruktion eines Transformationsvektors zur Übertragung eines ALAS-Gens auf Pflanzen

Zur Expression in Pflanzen wurde das *hemA* Gen aus *Rhodobacter sphaeroides* kodierend für eine ALAS isoliert. Dazu wurden die Oligodesoxynukleotide ALAS1 und ALAS2 konstruiert. ALAS1 hat die Sequenz 5'-gactgtgcatgcaggactacaatctggcactc-3', trägt am 5'-Ende eine SphI-Restriktionsschnittstelle und leitet sich im 3'-Bereich ab aus den Positionen 1950 bis 1967 des Genbankeintrags L07490 (SEQ ID Nr. 1). ALAS2 hat die Sequenz 5'-ctgactctgcagtcaggcaacgacctcggc-3', trägt am 5'-Ende eine PstI-Restriktionsschnittstelle und leitet sich im 3'-Bereich ab aus den Positionen 3170 bis 3153 des Genbankeintrags L07490.

Zur Amplifikation des *Rhodobacter sphaeroides* *hemA* Genfragmentes entsprechend den Positionen 1950 bis 3170 des Genbankeintrags L07490 wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Für den PCR-Ansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl 5 µl einer 1:10 in Wasser verdünnten stationären Kultur von *Rhodobacter sphaeroides* Stamm ATCC #35054 (kultiviert wie

angegeben im Katalog der American Type Culture Collection, Manassas, Virginia 20110-2209, USA), jeweils 10 nmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie jeweils 25 pmol von Primer ALAS1 und ALAS2 gemischt. Dem Reaktionsansatz wurde 1/10 Volumen 10x Taq-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1 % Gelatine und 1 % Triton X-100) zugesetzt. Die Ansätze wurden mit 3 Tropfen Paraffinöl überschichtet und anschließend im PCR-Gerät auf 94 °C erhitzt. Nach 2 min Inkubation wurden 2,5 u taq DNA-Polymerase zugegeben. Die PCR wurde in sukzessiven Thermo-Zyklen durchgeführt, die aus den drei folgenden Schritten bestanden: 1. Denaturierung der Doppelstrang-DNA bei 96 °C für 1 min; 2. Anlagerung der Primer an die Matrizen-DNA bei 50 °C für 1 min; 3. DNA-Synthese bei 72 °C für 3 min. Dieser Zyklus wurde 30mal hintereinander ausgeführt. Danach wurde der Ansatz für 5 min bei 60 °C inkubiert. Das 1247 bp große Reaktionsprodukt wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert und anschließend mit den Restriktionsenzymen SphI und PstI für die spätere Klonierung gespalten. Zur Klonierung wurde der Vektor pGEM3Zf- (Promega) mit SphI und PstI gespalten und das ca. 3100 bp Vektorfragment isoliert. Das SphI/PstI-Vektorfragment wurde mit dem 1235 b langen SphI/PstI-Fragment des hemA-PCR-Produktes ligiert. Mit dem Ligierungsprodukt wurde *Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene) transformiert. Die Sequenz des in pGEM3Zf- klonierten hemA-PCR-Produktes in dem erhaltenen Plasmid pALAS1 ist identisch mit dem Konsensus aus mehreren weiteren unabhängigen Plasmidklonen und ist in Seq ID Nr. 7 aufgeführt (ohne Klonierungsschnittstellen):

Das 1235 b lange SphI/PstI-Fragment aus pALAS1 wurde mit dem 222 bp PstI(2335)/HindIII(2557)-Fragment aus p35StpASN und dem 3438 bp langen HindIII(2557)/SphI(1199)-Fragment aus p35StpASN ligiert. Die Sequenz des Vektors p35StpANS ist angegeben in Sequenz ID NO. 8, die Plasmidkarte in Figur 1.

Legende Figur 1: Der Vektor pStpASN ist abgeleitet aus pUC18 (amp = beta-Lactamase) und enthält eine Cassette mit folgenden Elementen: 35S Promoter =

CaMV35S Promotor, tp'-tp'-tp' = modifiziertes chloroplastidäre Targetingsequenz der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphatcarboxylase aus Erbse, 35S Terminator = CaMV35S-Transkriptionsterminator).

Das Ligierungsprodukt der drei Fragmente wurde bezeichnet als pALAS2. In diesem Konstrukt ist die Sequenz kodierend für ALAS aus *Rhodobacter sphaeroides* am 5'-Ende über die SphI-Schnittstelle im Leserahmen fusioniert mit einer Sequenz kodierend für eine modifizierte chloroplastidäre Targetingsequenz. Diese Sequenz ist abgeleitet von der chloroplastidären Targetingsequenz der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphatcarboxylase aus Erbse und enthält eine interne Sequenzduplikation entsprechend den Positionen 985 bis 1041 in p35StpASN, welche als Positionen 1045 bis 1101 in p35StpASN wiederholt sind (vgl. Seq. ID Nr. 8). Die Transkription des Fusionsgens ist reguliert über den CaMV35S-Promotor.

Die ca. 2,2 kb Cassette enthaltend 35S-Promotor, Targetingsequenz, ALAS-Gen und 35S-Terminator wurde mittels EcoRI aus pALAS2 herausgeschnitten und die überhängenden DNA-Enden dieses Fragments mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Der Vektor pcva13 (Seq. ID. Nr. 9, Plasmidkarte in Figur 2) wurde mit SnaBI linearisiert, mittels alkalischer Phosphatase dephosphoriliert und mit dem ca. 2,2 kb langen, aufgefüllten Fragment aus pALAS2 ligiert. Von den erhaltenen Ligierungsprodukten wurde ein Plasmid, bei welchem die Leserichtung des hemA-Gens und des PAT-Gens gleichgerichtet sind, als pALAS3f bezeichnet (vgl. Figur 3).

Legende Figur 3: Der Vektor pcva13 (amp = beta-Lactamase) enthält eine Cassette mit folgenden Elementen: P-35S = CaMV35S Promotor, PAT = Phosphinothricin-Acetyltransferase, T-35S = CaMV35S-Transkriptionsterminator.

Beispiel 2: Herstellung von Pflanzen, welche das hemA-Gen exprimieren

Zur Herstellung transgener Mais-Pflanzen, welche eine Expressionscassette für das hemA-Gen aus *Rhodobacter sphaeroides* enthalten, wurde eine Transformation wie beschrieben in EP-A 0 469 273 durchgeführt, wobei abweichend als zu transferierende DNA pALAS3f eingesetzt wurde. Es wurden 41 unabhängige Mais-

Transformanten erhalten. Aus diesen als M23T1, M25T1 bis M25T13 und M27T1 bis M27T27 bezeichneten Linien wurden wie beschrieben Pflanzen regeneriert. Die Anwesenheit des vollständigen hemA-Gens wurde in allen transgenen Pflanzen mittels PCR unter Einsatz der Oligodesoxynukleotide ALAS1 und ALAS2 (siehe Beispiel 1) als PCR-Primer nachgewiesen.

Beispiel 3: Phänotypische Charakterisierung hemA-exprimierender Pflanzen

Zunächst wurde die Toleranzschwelle der nicht-transformierten Maislinie gegenüber dem GSAAT-Inhibitor 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure bestimmt. Dazu wurden die Mais-Samen oberflächensterilisiert, indem sie unter sterilen Bedingungen erst für 1 min in 70 % Ethanol, dann für 20 min in 5 % Natriumhypochlorit, 0,1 % Tween 20 und abschließend sechsmal kurz in sterilem Wasser gewaschen wurden. Die Samen wurden dann steril auf Murashige & Skoog-Medium (Micro- und Makronährstoffe, Sigma GmbH #M5524) enthaltend 90 g/l Saccharose und 8 g/l Agar ausgelegt und für sechs Tage bei Raumtemperatur unter Tageslicht-Leuchtstoffröhren bei 12 h Licht/12 h dunkel angezogen bis das zweite Blatt sichtbar wurde. In diesem Stadium wurden die Pflänzchen auf frisches Medium mit verschiedenen Konzentrationen 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure gesetzt.

Nach weiteren 10 Tagen Kultur der Pflanzen wurde der Einfluß des Inhibitors erfaßt. Bei einer 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure Konzentration von unter 5 µM war die Biomasseproduktion im Rahmen der üblichen Schwankungen unverändert. Bei 100 µM 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure war die Biomasseproduktion deutlich herabgesetzt und das unter Einwirkung von 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure neu gebildete Gewebe war deutlich chlorotisch.

Folgende Feuchtgewichte wurden für die nicht-transgenen Pflanzen sechs Tage nach Medienwechsel festgestellt (jeweils Mittelwerte aus zehn Einzelpflanzen ohne Wurzel und Reste des Samenkorns):

0 µM 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure:	3,89 g
1 µM 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure:	4,15 g

5 µM 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure:	3,82 g
10 µM 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure:	3,12 g
100 µM 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure:	1,53 g

Die Toleranz von transgenen Linien gegenüber 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure wird im Vergleich mit der nicht-transgenen Ausgangslinie ermittelt. Dazu werden fünf Regeneratpflanzen je Linie, die in ihrer Größe und Bewurzelung optisch den oben beschriebenen Sämlingen nach sechs Tagen Keimung entsprechen, auf Medien ohne 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure (eine Pflanze) und mit 100 µM 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure (vier Pflanzen) umgesetzt und weiterkultiviert. Alle Regeneratpflanzen der nicht-transgenen Linie zeigen wie zuvor unter Einwirkung von 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure deutliche Chlorose und verringerte Biomasseproduktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die transgenen Linien zeigen auf Medium ohne 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure einen zu den nicht-transgenen Pflanzen unter diesen Bedingungen vergleichbaren Phänotyp. Bei den meisten transgenen Linien mit dem erfindungsgemäßen ALAS-Gen zeigt jedoch keine der Regeneratpflanzen in Anwesenheit von 100 µM 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure Chlorosen oder reduziertes Wachstum gegenüber ihrer jeweiligen unbehandelten Kontrolle auf Medium ohne 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure.

Beispiel 4: Gentechnische Produktion und Reinigung der GSAAT

Die mature GSAAT aus *Hordeum vulgare* wurde mittels der Sequenz ID Nr. 6 gentechnisch in *Escherichia coli* hergestellt. Dazu wurde der *Escherichia coli* Stamm TG1 (Gibson (1984) PhD Thesis, Cambridge, UK) gleichzeitig mit dem Expressionsplasmid pATE19 (Berry-Lowe et al. (1992) Plant Physiology 99:1597-1603) und dem Plasmid pGroESL (Goloubinoff et al. (1989) Nature 337:44-47) transformiert. Transformierte Klone wurden stets in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) mit 100 mg/l Ampicillin und 30 mg/l Chloramphenicol kultiviert.

Das Zellsediment wurde in 150 ml Puffer A (50 mM Tricin/NaOH pH 7,9, 25 mM $MgCl_2$) resuspendiert. Die Zellen wurden dann mittels drei Passagen durch den French Press-Homogenisator (French Pressure Cell Press und 35 ml Aufschlußzelle von SLM Instruments, Inc., Rochester NY 14625 USA) bei 16000 psi und 4 °C aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde anschließend für 30 min bei 25000 g und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen.

Zur Chromatographie wurde eine DEAE-Sepharose Fast Flow Säule (Pharmacia GmbH, Freiburg) mit einem Bettvolumen von 500 ml mit Puffer A äquilibriert. Der klare Überstand der aufgeschlossenen Zellen wurde auf diese Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule zunächst mit 250 ml Puffer A und dann mit 1500 ml Puffer B (50 mM Tricin/NaOH pH 7,9, 25 mM MgCl₂, 20 mM NaCl) gespült. Die Elution der rekombinanten GSAAT fand mit 750 ml Puffer C (50 mM Tricin/NaOH pH 7,9, 25 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) statt. Das Eluat wurde in Fraktionen á 25 ml gesammelt und die Fraktionen, welche funktionelle GSAAT enthielt, wurde mittels eines GSAAT-Aktivitätstests an Proben aus den Fraktionen ermittelt. Aus 5 l Expressionskultur wurden 25 nkat GSAAT erhalten.

Beispiel 5: Bestimmung der enzymatischen Aktivität der GSAAT

Die Aktivität der GSAAT wurde durch einen photometrischen Nachweis des derivatisierten Reaktionsproduktes 5-Aminolevulinsäure nachgewiesen. Der Aktivitätstest wurde in einer 96-Well Flachboden-Microtiterplatte (F-Form) aus Polystyrol durchgeführt.

In den Vertiefungen der Microtiterplatte (Wells) konnte die gewünschte Anzahl an Einzelmessungen parallel durchgeführt werden. Die folgenden Angaben beziehen sich jeweils auf eine Vertiefung der Microtiterplatte (MTP).

Bei einer Temperatur von 20 °C wurden 100 µl Enzymlösung (25 pkat/ml rekombinante GSAAT aus *Hordeum vulgare*, 250 mM BisTris/HCl pH 6,5) und 10 µl 25 % (v/v) Dimethylsulfoxyd in Wasser vorgelegt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 1,8 mM Glutamat-1-Semialdehyd gelöst in 100 mM HCl gestartet.

Unmittelbar nach dem Start der enzymatischen Reaktion wurde der Ansatz für 30 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurden sofort 25 µl Acetoessigsäureethylester zugesetzt, der Ansatz gut durchmischt und für 30 min bei 40°C inkubiert. Direkt im Anschluß wurde 100 µl Ehrlichs Reagenz (s. u.) zugesetzt und der Ansatz für 30 min bei 20 °C inkubiert. Nach Abschluß der Inkubation wurde sofort mit Hilfe eines Microtiterplattenphotometers die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt.

Zur Bestimmung der enzymatisch gebildeten Menge an 5-Aminolevulinsäure wurde zunächst der Blindwert (s. u.) von der Absorption des zu bestimmenden Ansatzes abgezogen. Aus dem Differenz aus Meßwert und Blindwert wurde mit Hilfe einer Eichreihe die Konzentration an 5-Aminolevulinsäure im Reaktionsansatz zum Zeitpunkt unmittelbar vor Zugabe des Acetoessigsäureethylesters berechnet. Die Eichreihe wurde erzeugt, indem jeweils 100 µl verschieden konzentrierter 5-Aminolevulinat-Lösungen in 250 mM BisTris/HCl pH 6,5 zunächst für 30 min bei 20 °C inkubiert wurden, dann mit 25 µl Acetoessigsäureethylester gemischt und 30 min bei 40 °C inkubiert wurden, anschließend mit 100 µl Ehrlichs Reagenz versetzt und 30 min bei 20 °C inkubiert wurden und die Absorption der erhaltenen Lösung sofort mit Hilfe eines Microtiterplattenphotometers bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt wurde. Die Konzentration an 5-Aminolevulinsäure in den 100 µl 250 mM BisTris/HCl pH 6,5 wird bei diesem Vorgang in parallelen Ansätzen zwischen 0 µM und 150 µM variiert (0 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM).

Zur Bestimmung eines Blindwertes (s. o.) als Referenz zu dem gemessenen Absorptionswert einer GSAAT-Reaktion wurde ein paralleler GSAAT-Aktivitätstest

durchgeführt, bei welchem 1.) die enzymatische Aktivität der GSAAT blockiert wurde und der 2.) ansonsten unter den exakt gleichen Bedingungen wie der zu vergleichende Ansatz durchgeführt wurde. Zur Blockierung der GSAAT-Aktivität wird vor Reaktionsstart anstelle von 10 µl 25 % (v/v) Dimethylsulfoxyd/Wasser (s. o.) 10 µl einer Lösung von 10 mM Aminooxyessigsäure in 25 % (v/v) Dimethylsulfoxyd/Wasser zusammen mit der Enzymlösung vorgelegt.

Zusammensetzung von Ehrlichs Reagenz:

1 g 4-(Dimethylamino)-benzaldehyd in 30 ml Eisessig lösen und anschließend mit 8 ml 70 % Perchlorsäure mischen. Diese Lösung mit Eisessig auf ein Endvolumen von 50 ml bringen.

Beispiel 6: Identifikation von Effektoren der GSAAT

Zur Auffindung neuer Effektoren der GSAAT wurde eine Anzahl von unterschiedlichen chemischen Substanzen in bezug auf ihre Wirkung durchmustert. Substanzen oder Verbindungen, welche unter den Bedingungen des GSAAT-Aktivitätstests ungünstige chemisch reaktive Eigenschaften aufwiesen, z. B. Alkylierung, Halogenierung, Oxidation, Reduktion oder sonstige unspezifische kovalente Modifizierungen von Proteinen oder den eingesetzten Enzymsubstraten verursachen, sind nicht enthalten. Die Verbindungen wurden in einer Konzentration von 100 µM in 25 % (v/v) DMSO/Wasser gelöst.

Zur Bestimmung der Wirkung dieser Verbindungen auf die enzymatische Aktivität der GSAAT wurden von jeder Verbindung 10 µl der 100 µM Lösung in eine Vertiefung einer 96 Well MTP (s. o.) gegeben. 90 Vertiefungen einer MTP wurden auf diese Weise mit Lösungen der zu untersuchenden Verbindungen versehen. Zur Bestimmung der Aktivität der nicht inhibierten GSAAT (Kontrollreaktion) wurden 3 Vertiefungen der gleichen MTP mit jeweils 10 µl 25 % (v/v) DMSO/Wasser versehen und zur Bestimmung von Blindwerten wurden die restlichen 3 Vertiefungen mit jeweils 10 µl einer Lösung von 10 mM Aminooxyessigsäure in 25 % (v/v) Dimethylsulfoxyd/Wasser versehen.

Die Lösungen in den Vertiefungen der MTPs wurden dann mit je 100 μ l Enzymlösung (25 μ kat/ml rekombinante GSAAT aus *Hordeum vulgare*, 250 mM BisTris/HCl pH 6,5) gemischt. Die enzymatische Reaktion wurde in allen Vertiefungen einer MTP zeitgleich durch Zugabe von 5 μ l 1,8 mM Glutamat-1-Semialdehyd gelöst in 100 mM HCl gestartet. Die weiteren Schritte waren identisch mit der unter Beispiel 2 beschriebenen Vorgehensweise nach dem Start der enzymatischen Reaktion.

Für jede MTP konnte dann aus dem Mittelwert der Meßergebnisse für die Wells mit den Kontrollreaktionen und dem Mittelwert der Wells mit den Blindwerten die Aktivität der nicht inhibierten GSAAT bestimmt werden. Ebenso wurde für jedes Well dieser MTP, in welchem eine zu untersuchende Substanz eingesetzt wurde, durch Abzug des Mittelwertes der Blindwerte die GSAAT-Aktivität bestimmt. Durch Vergleich der Aktivität der GSAAT in Anwesenheit einer zu untersuchenden Substanz und der Aktivität in Abwesenheit der zu untersuchenden Substanz (Kontrollreaktionen) wurde bestimmt, ob die Substanz effektorisch, d.h. hemmend oder aktivierend auf den GSAAT Aktivitätstest wirkt.

Verbindungen, die eine relative Reduktion der GSAAT-Aktivität um mehr als 30 % gegenüber den Kontrollreaktionen bewirken, wurden als potentielle Effektoren genauer untersucht.

Beispiel 7: Bestimmung der Wirkstärke der GSAAT-Effektoren

Die Wirkstärke eines Effektors der GSAAT wurde bestimmt, indem der GSAAT-Test (vgl. Beispiel 2) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Effektors in der Reaktionslösung durchgeführt wurde. Dabei wurden Konzentrationen von 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M und 300 μ M des Effektors eingesetzt. Die Inhibitor-Konstanten wurden anhand der aus den gemessenen Werten abgeleiteten Aktivitäten nach den von Bergmeyer ausführlich beschriebenen Methoden berechnet (Grundlagen der enzymatischen Analyse; hrsg. von Hans Ulrich Bergmeyer, Verlag Chemie Weinheim, New York, 1977, ISBN 3-

527-25677-6), die Konstanten für Aktivatoren konnten in analoger Weise ermittelt werden.

Beispiel 8: Lemna-Test

Die phytotoxische Wirkung von GSAAT-Inhibitoren konnte auch in vivo durch Behandlung von Lemna Kulturen festgestellt werden.

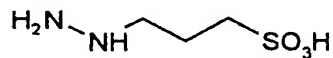
Dazu wurde *Lemna gibba* in steriler Kulturlösung (0,4 g/l KNO_3 , 0,8 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,366 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l KH_2PO_4 , 2 ml/l Lösung I (2,23 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 83 mg/l KJ, 2,5 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,86 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,62 g/l H_3BO_3 , 25 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) und 2 ml/l Lösung II (14,92 g/l Na-EDTA, 10,92 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)) kultiviert. Jeweils 3 Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen in die einen 100 ml Erlenmeyerkolben gesetzt, welcher mit 50 ml Kulturlösung enthaltend den GSAAT-Inhibitor in einer Konzentration von 20 μM gefüllt war. Die Kulturkolben wurden bei 25 °C im Abstand von 70 cm mit zwei 36 W Tageslicht-Leuchtstoffröhren beleuchtet (24 h Dauerlicht). Das Wachstum und das äußere Erscheinungsbild der Lemna-Pflanzen wurde über 7 Tage hinweg beobachtet und mit dem Wachstum und dem äußeren Erscheinungsbild von Lemna-Pflanzen verglichen, die in Kulturlösung ohne Inhibitor unter ansonsten identischen Bedingungen kultiviert wurden.

Charakteristisch für die phytotoxische Wirkung eines GSAAT-Inhibitors war eine Chlorose der neu gebildeten Gewebe. Bei hohen Lichtintensitäten konnte auch eine Nekrose des pflanzlichen Gewebes auftreten. Schnell wirkende Verbindungen führten oft schon nach einem Tag zum kompletten Absterben der Pflanzen während die langsamer wirkenden Verbindungen zunächst eine Wachstumsdepression zur Folge hatten.

Beispiel 9: Inhibitoren der GSAAT

Mit Hilfe des oben beschriebenen Verfahrens wurde die folgende herbizid wirksame Verbindung A (Hydrazinopropylsulfonsäure, Sulfopropylhydrazin) gefunden:

Verbindung A:



Die Verbindung A führte bei einer Konzentration von 6 μM zu einer 50 %igen Reduktion der GSAAT-Aktivität.

Im Lemnatest führte Verbindung A innerhalb von 48 h zu Chlorosen und einer Wachstumsdepression der Pflanzen. Nach 72 h waren mehr als 60 % der Pflanzen abgestorben.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, transgener Pflanzenzellen, transgener Pflanzenteile, transgener Pflanzensamen, transgenen Vermehrungsguts, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer 5-Aminolävulinsäure Synthase (ALAS), ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon stabil in das pflanzliche Genom integriert werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon durch Plastidentransformation stabil in das pflanzliche Plastom integriert werden.
3. Verwendung mindestens eines Nukleinsäuremoleküls kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS, bakteriellen, eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen.
4. Verwendung mindestens eines Nukleinsäuremoleküls kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, oder eines aktiven Fragments daraus, zur Expression eines Proteins mit der Funktion einer ALAS oder eines aktiven Fragments daraus in transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen.

5. Verwendung mindestens eines Nukleinsäuremoleküls kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen, deren Expression eines Proteins mit der Funktion einer GSAAT oder eines aktiven Fragments daraus supprimiert oder inhibiert ist.
6. Nicht-natürlich vorkommendes chimäres Gen, mindestens enthaltend einen für die Expression einer ALAS, ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, in Pflanzen geeigneten Promotor, der funktionell verknüpft ist mit einem DNA-Molekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon.
7. Transgene Pflanze, transgene Pflanzenzellen, transgene Pflanzenteile, transgene Pflanzensamen, transgenes Vermehrungsgut, enthaltend ein DNA-Molekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, ausgewählt aus der Gruppe der feedback-regulierten ALAS, tierischen ALAS und bakteriellen ALAS, oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon.
8. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, transgener Pflanzenzellen, transgener Pflanzenteile, transgener Pflanzensamen, transgenen Vermehrungsguts, bei dem ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer 5-Aminolävulinsäure Synthase (ALAS), eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon stabil in das pflanzliche Genom integriert werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze eine monokotyle Pflanze ist.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon durch Plastidentransformation stabil in das pflanzliche Plastom integriert werden
10. Verwendung mindestens eines Nukleinsäuremoleküls kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze eine monokotyle Pflanze ist.
11. Verwendung mindestens eines Nukleinsäuremoleküls kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, oder eines aktiven Fragments daraus, zur Expression eines Proteins mit der Funktion einer ALAS oder eines aktiven Fragments daraus in transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze eine monokotyle Pflanze ist.
12. Verwendung mindestens eines Nukleinsäuremoleküls kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen, deren Expression eines Proteins mit der Funktion einer GSAAT oder eines aktiven Fragments daraus supprimiert oder inhibiert ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze eine monokotyle Pflanze ist.
13. Nicht-natürlich vorkommendes chimäres Gen, mindestens enthaltend einen für die Expression einer ALAS, in Pflanzen geeigneten Promotor, der funktionell verknüpft ist mit einem DNA-Molekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS oder eines aktiven Fragments daraus oder einer

antisense oder komplementären Sequenz davon, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze eine monokotyle Pflanze ist.

14. Transgene-Pflanze, transgene Pflanzenzellen, transgene Pflanzenteile, transgene Pflanzensamen, transgenen Vermehrungsgut, enthaltend ein DNA-Molekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer ALAS, oder eines aktiven Fragments daraus oder einer antisense oder komplementären Sequenz davon, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze eine monokotyle Pflanze ist.
15. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2, 8 und/oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Nukleinsäuremoleküle unter der Kontrolle eines feedback-regulierten Promotors stehen.
16. Verwendung eines feedback-regulierten Promotors in einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1, 2, 8, 9 und 15.
17. Rekombinanter Vektor, enthaltend ein chimäres Gen gemäß Anspruch 6 oder 13.
18. Transgene Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzenzelle, mit einem chimären Gen gemäß Anspruch 6 oder 13 oder einem Vektor gemäß Anspruch 17 transformiert und/oder genetisch modifiziert ist.
19. Pflanze, Pflanzenzellen, Pflanzenteile, Pflanzensamen, Vermehrungsgut gemäß Anspruch 7, 14 oder 18 herstellbar nach einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1, 2, 8, 9 oder 15.
20. Pflanze gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nutz- oder Zierpflanze ist.

21. Pflanze gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Maispflanze ist.
22. Verfahren zur Bestimmung der effektorischen Wirkung einer Testsubstanz bezüglich der Aktivität einer GSAAT, worin man
 - a) die enzymatische Aktivität der GSAAT in Abwesenheit einer Testsubstanz bestimmt;
 - b) die enzymatische Aktivität der GSAAT in Anwesenheit einer Testsubstanz bestimmt; und
 - c) die unter a) und b) ermittelten enzymatischen Aktivitäten vergleicht.
23. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß in einem automatisierten Testsystem zum Prüfen der effektorischen Wirkung von Testsubstanzen angewendet wird.
24. Verfahren zur Auffindung herbizider Wirkstoffe, dadurch gekennzeichnet, daß die zu testende Substanz in einen Verfahren gemäß Anspruch 22 getestet wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Testsubstanz zusätzlich einem Lemna-Test unterworfen wird.
26. Verwendung von Effektoren der GSAAT als Herbizid.
27. Verwendung einer Verbindung, die in einem Testverfahren auf Effektoreigenschaften gegenüber GSAAT gemäß Anspruch 22 mindestens einer molaren Konzentration im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-7} eine mindestens 30 %ige Inhibitorwirkung aufweist, als Herbizid.
28. Verwendung gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung auch im Lemna-Test aktiv ist.

29. Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs in Nutzpflanzenkulturen, dadurch gekennzeichnet, daß man auf den Ort der Nutzpflanze, die Nutzpflanze oder deren Vermehrungsgut ein herbizides Mittel aufbringt, enthaltend eine Verbindung, die in dem Testverfahren gemäß Anspruch 22 bei mindestens einer molaren Konzentration im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-7} molar eine mindestens 30 %ige Inhibitorwirkung aufweist, als Herbizid eine mindestens 30 %ige Inhibitorwirkung gegenüber GSAAT aufweist.
30. Verfahren gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung auch im Lemna-Test aktiv ist.
31. Verfahren gemäß Anspruch 29 und/oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Nutzpflanze eine transgene Pflanze gemäß Anspruch 7 oder 14 ist.
32. Verfahren zum Bekämpfen von unerwünschten Pflanzenerwuchs in Nutzpflanzenkulturen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nutzpflanze gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 7, 14, 19, 20 und/oder 21 einsetzt, und auf den Ort dieser Pflanze, die Pflanze selbst oder deren Vermehrungsgut ein herbizides Mittel aufbringt, dessen Wirkmechanismus zumindest teilweise auf einer Inhibition der pflanzlichen GSAAT beruht.

1 / 3

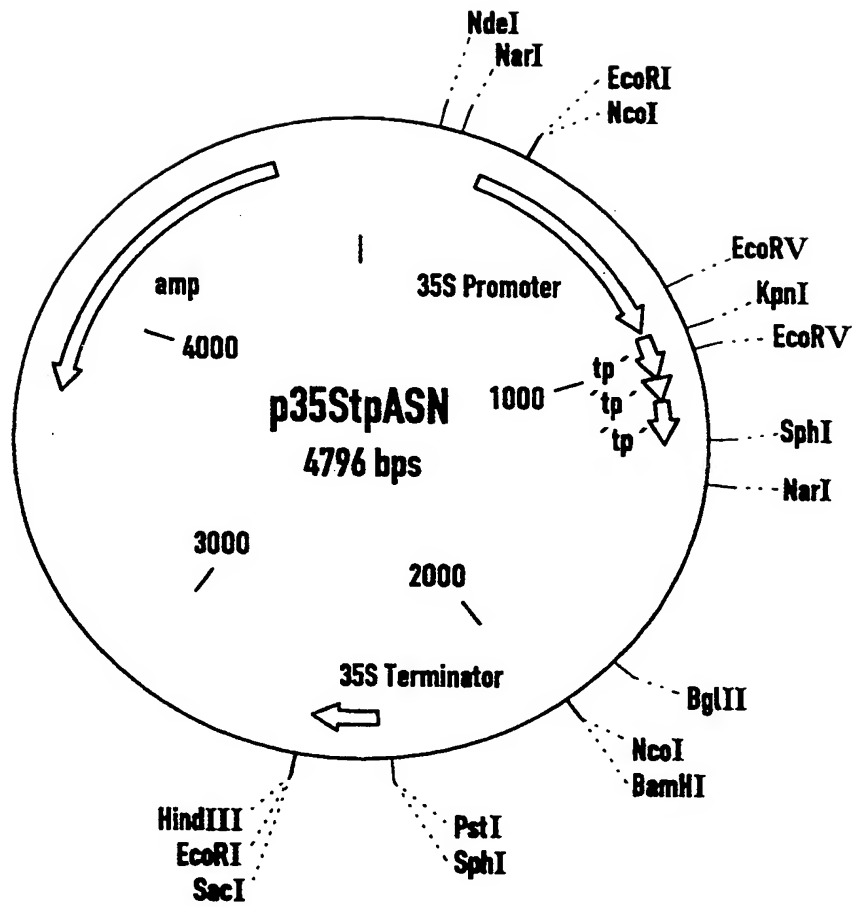


Fig. 1

2 / 3

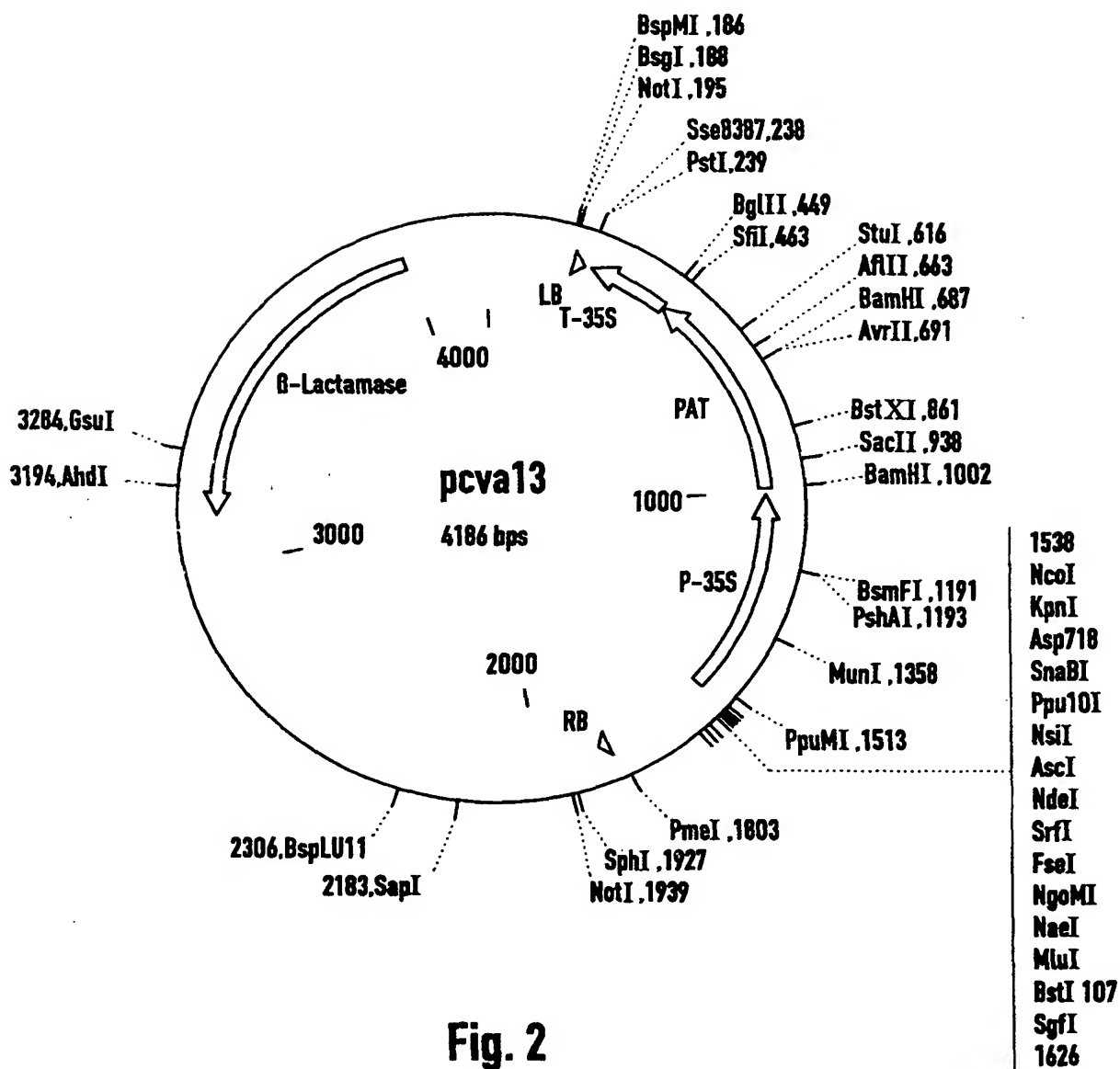


Fig. 2

3 / 3

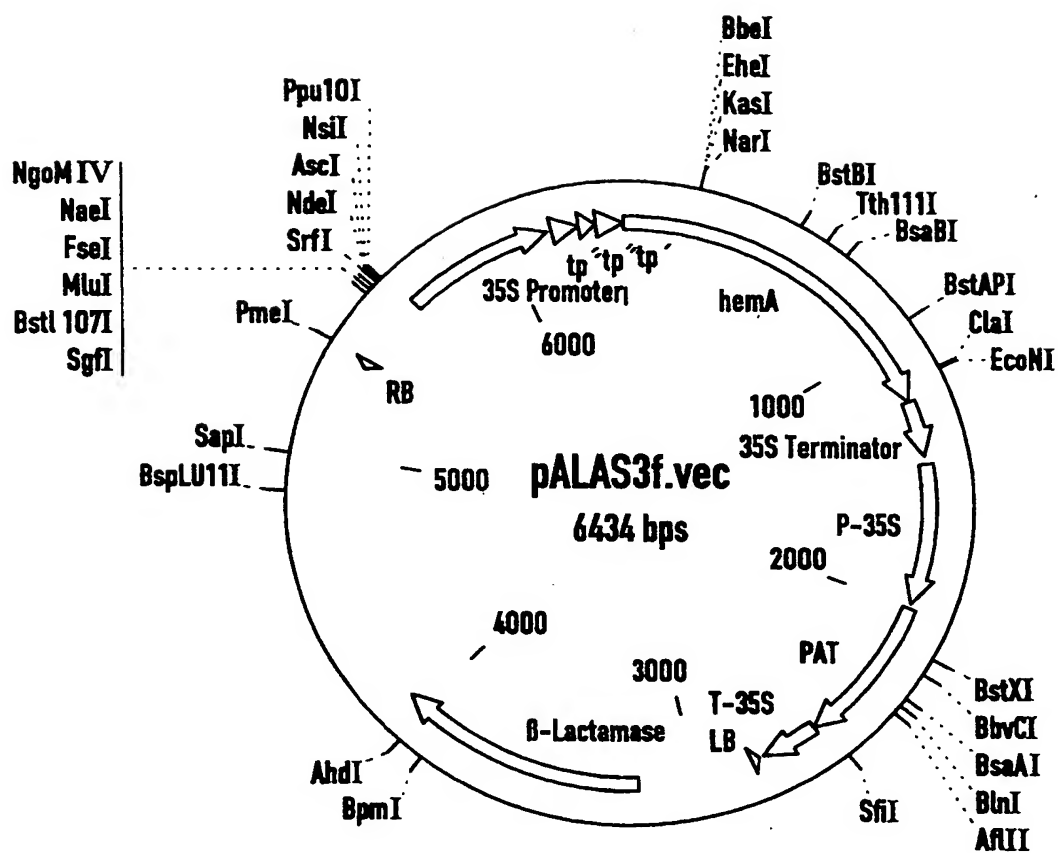


Fig. 3

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Hoechst Schering AgrEvo GmbH
- (B) STRASSE: -
- (C) ORT: Frankfurt
- (D) BUNDESLAND: -
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 65926
- (G) TELEPHON: 069-305-7427
- (H) TELEFAX: 069-305-2200
- (I) TELEX: -

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit veraendelter 5-Aminolaevulinsaeure-Biosynthese und Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der 5-Aminolaevulinsaeure Synthese

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 3681 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Rhodobacter sphaeroides hema

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..3681

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGATCCTGCT CGCCCACGAG GCGGAAGCTG ACCTTGGCAT GGGCCTCGGC GGGCAGCACC 60

GTCTTGAAGC CCGCCCCGGT ATAGCCGCCC CAGATGCCGT TGATCTCGCA GGTGGGGCGC 120

GACCAGATCA TCTCGAGGGG TGTGCGATCC TCTTCGCCTG CGGGCTGCGA GAGGCCCACG 180

TCGCCGAGGA AGCGCGCGTG ATCGAAGGCG AGCCCCTGCC ACTGGGCGCG GATCGCCTCG 240

GGCAATTTCGC TCACGCCGTC GTAGAAGCCG GGCAGGGTGA CGCGGCCGGT CTCGTCGTGA 300
AGGGCCGCGA GCGCGCGGGT CAGCACGCGG ATCGGGTTGA TCGCGACCCC GCCATACATG 360
CCGGAATGCA GGTCTTTCGA GGGGCCGCGC ACCACCAGCT CCTCGCCCAG CAGGCCGCGC 420
AGCATGGTCA CGATGGCGGG CGTGCGCGAT TCGAAGAGGC CGGTGTCGCA GATCAGCGCC 480
ACATCCGCGG TCAGCTCTTC GGCATTCTCC TTCATGAAGG GCACGAGCGA GGGCGAGCCC 540
GATTCTCTCT CGCCCTCGAG GAAGATCGTG AGGCGGCAGG GCAGCGTGCC GTGCTCGGCC 600
TTCCAGGCGC GGCAGGCCTC GAGGAAGGTC ATGAGCTGGC CTTGTCTGTC GGAGGCGCCG 660
CGGCCGCGGA TCACCTTGCC GCGCGGCGTC TCCTCGATCG CCGGCTCGAA GGGCGGACGG 720
TCCCAGAGCG AGAGCGGATC GACGGGCTGC ACGTCGTAAT GGCCGTAGAA CAGCAGGTGC 780
GGCCCTTGAC CCGGGGCATG AGCCACCACC ATCGGATGGC CGGGGGTGGG GCGCTTCGAG 840
ACCTCGAAGC CCAGCGACGC GAGATCGGCC ACCAGCCAGT CGGCGGCGGC CTCGCATTCTG 900
GCGGCATGGG CGGGATCGGT CGAGATCGAG GGGATGCGCA ACAGCGCCAT CAGCCGGTCC 960
AGAGCCTCGG GCAGGCCGGT GTCGATCCGG GTGAGCACGG CGTCGAGCGT CATCGTCTGG 1020
TCCTTCCACG TCCAATGTGT CCGCCGACG ACGGCGGGCG GAGCGGTGCC CTTGCGCGGA 1080
CTCGGCTCCT GCGCGTCCCG GTATGGGCCG CGGCTAAGGG CGAAGTCAAT TTGGAGGATG 1140
GCCGTGGGGC AGGGCGGGGG GCGTTCACAA GACGGGGAGG CTCTGTGCAG GAGGGGCGCG 1200
GTGGGCTAAG AGGGCCGCGA CAGGGTGCAG GTGGAGAGGA TCATGCGTCT GGCAATGGTG 1260
GCAGCCCTCG GGATCTTGAC GCGGGGGGCT GCGCTCGCCC AGCCGGTGAC GGGCCGCGAG 1320
GCGAAGAAGA TGCTCTTTCC CCCCAGCAAG GCCGAGGTGG AGATCCTGCC GGTCGCCTTC 1380
CTCTCCGAGA ACGACCGCGC GCTCCTGCGC ATGGTGGTGA GCGAGCAGCC CTATTACGGG 1440
GCCATCGCCG TCTCGCCCGA TGAGGGGCTG GCCTCGGAGG CGACCATCGC GGCCGCGAAC 1500
CATCACACGA CCGAGGCCGC GCGCGCGGCC GCGCTCGCGG TCTGCGAGGA GAAGCGCAAG 1560
GGCAGGGCGC CGTGCGCGAT CGTGGGATTC GTGCGCCCCA AGGGCTGGAA GAGCCGCCCC 1620
CTCAGCCTAT CGTCCGATGC AACCAGAGGA TTCCGGGCCG ACTATGGCGC CCGCGGCCCC 1680
AGGGCGCTGG CGGTCTCGCC GGCCACCGGG CGCTGGGGCA TCGGGACCGG AGCGGGGGCG 1740
GGAGAGAAGG CGCTTGCTGC CTGCGCGAAG GCCGGAGGCG CCGGGGATTG CGTGCTGGCG 1800
GTGGCCGATT GACGCAGGGA CCAATGAACG GGTTTCAAT TGGCCGGTTC CAGACTTAGG 1860
ATTTGATCCT TATCAAGGCC ATGTTGCGCC GAAAATTGAT GATGACACCC AGCTTGCTCG 1920

GCAGCCCGAG CGTCAGGGAG ACGAAGATGG ACTACAATCT GGCACTCGAT ACCGCTCTGA	1980
ACCGGCTCCA TACCGAGGGC CGGTACCGGA CCTTCATCGA CATCGAGCGG CGCAAGGGTG	2040
CCTTCCCGAA AGCCATGTGG CGCAAGCCCG ACGGGAGCGA GAAGGAAATC ACCGTCTGGT	2100
GCGGCAACGA CTATCTCGGC ATGGGCCAGC ATCCGGTGGT GCTGGGGGCC ATGCACGAGG	2160
CGCTGGATTC GACCGGCGCC GGGTCGGGCG GCACGCGCAA CATCTCGGGC ACCACGCTCT	2220
ATCACAAGCG CCTCGAGGCC GAGCTCGCCG ACCTGCACGG CAAGGAAGCG GCGCTGGTCT	2280
TCTCGTCGGC CTATATCGCC AACGACCGA CCCTCTCGAC GCTGCCGAG CTGATCCCGG	2340
GCCTCGTCAT CGTCTCGGAC AAGTTGAACC ACGCTTCGAT GATCGAGGGC ATCCGCCGCT	2400
CGGGCACCBA GAAGCACATC TTCAAGCACA ATGACCTCGA CGACCTGCGC CGGATCCTGA	2460
CCTCGATCGG CAAGGACCGT CCGATCCTCG TGGCCTTCGA ATCCGTCTAT TCGATGGATG	2520
GCGACTTCGG CCGCATCGAG GAGATCTGCG ACATCGCCGA CGAGTTCGGC GCGCTGAAAT	2580
ACATCGACGA GGTCCATGCC GTCGGCATGT ACGGCCCCCG CGGCGGCGGC GTGGCCGAGC	2640
GGGACGGGCT GATGGACCGG ATCGACATCA TCAACGGGAC GCTGGGCAAG GCCTATGGCG	2700
TGTTCCGGCG CTATATCGCG GCCTCGTCAA AGATGTGCGA CGCGGTGCGC TCCTACGCGC	2760
CGGGCTTCAT CTTCTCGACC TCGCTGCCGC CCGTCGTGGC GGCCGGTGCG GCGGCCTCGG	2820
TGCGCCACCT CAAGGGCGAT GTGGAGCTGC GCGAGAAGCA CCAGACCCAG GCCCGCATCC	2880
TGAAGATGCG CCTCAAGGGG CTCGGCCTGC CGATCATCGA CCACGGCTCG CACATCGTGC	2940
CGGTCCATGT GGGCGACCCC GTGCACTGCA AGATGATCTC GGACATGCTG CTCGAGCATT	3000
TCGGCATCTA TGTCCAGCCG ATCAACTTCC CGACCGTGCC GCGCGGGACC GAGCGGCTGC	3060
GCTTACCCCC GTCGCCCCGTG CATGATTCCG GCATGATCGA TCACCTCGTG AAGGCCATGG	3120
ACGTGCTCTG GCAGCACTGT GCGCTGAATC GCGCCGAGGT CGTTGCCTGA CAGCTTCTGC	3180
GGATGCAAAG GCCCCTGCCC TGTGCTACTT CTTTCGGGAC AGGGCACCCC TGAGTCGGAA	3240
GCAACCGGCC GGGGTAAATC GGGGCAGGAC GGGCACACGC ATGATCTGGC GGAGGACACA	3300
ACCTTCGACG GCCGAAGTCG ATAAACCCAA AGGGTTCGAC GATTTGAGT TCGGGTTGGG	3360
CGACCTGATG CGCGGTGAGC GGGCGACGCT CGGCAAGTCG CTGCTCGATG TCCAGCGCGA	3420
GCTGAAGATC AAGGCCACCT ATATCGCCGC CATCGAGAAT GCCGACGTGT CGGCCTTCGA	3480
GACGCAGGGC TTCGTGGCGG GATATGTGCG CTCCTATGCG CGCTATCTCG GCATGGACCC	3540
GGACGAGGCC TTCGCGCGCT TCTGCCACGA GGCGAACTTC ACCACGATGC ACGGCATGGC	3600
CGTTTCGGTG ACCGGCGCGC GCCGCGATAC CGGTCCGCGG TCCCGACCGC AGGGCGAGGG	3660

GCGCGATCCG CTGGCGGATC C

3681

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1881 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Rhodobacter sphaeroides hemT

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..1881

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CATGGTTTCGC TTCTCGGTGC GGCCGGATCG TTCGGAACGC CGGCGGAGGA TCGGGTGCCA	60
CGCCAGAAGA GACGGCGCAT CGGGAACGGA GACCGGACGC AAGGGAAGAC TGGCCCATCG	120
AGCGCGTCAG GTTGAACAGA GACTCACGGC ACGCGCCGTA CCTACACCCA TACAAATCTC	180
TGTTCAATGT ATGGTTCATG TCTTCGTGGG GAAGAAGGGT GGCCCCCTAT TCTCTAACAA	240
TGTCCAGGGA AGTGTGCGCA CGTTTCGCCG CGCATCACGC GTGCGTCAGG AGTGTGAGCG	300
GCAAAATGTC CGTTGATTCA TCCAGATTGT AAGCCATACA AATGGCCGAT AGGCGGCTCG	360
GCAATGCCTG CCGCGATGCG TGTGCTCCA ACAGAAGGTG ATCCCCATGG AGTTCTCTCA	420
GCACTTCCAG AAGCTCATTG ACGACATGCG ACTGGACGGG CGGTACAGGA CGTTCGCGGA	480
ACTCGAGCGC ATCGCCGGGG AGTTTCCGAC CGCGCTCTGG CATGGTCCGG ACGGGCAGGC	540
CAGACGCGTG ACGGTCTGGT GCAGCAACGA CTATCTGGGC ATGGGCCAGA ACGCCGAAGT	600
GCTGGCCGCG ATGCACCGGT CGATCGATCT GTCGGGCGCC GGCACCGGAG GCACCCGCAA	660
CATCTCGGGG ACCAACCAGG AGCACGTCGC CCTCGAGGCG GAACTTGCGG ACCTGCACGG	720
CAAGGAATCC GCGCTCATCT TCACCTCCGG GTGGATCTCC AACCTCGCGG CTCTGGGCAC	780
GCTGGGCAAG ATTCTGCCCC AATGCGCGAT CTTCTCGGAT GCGCTGAACC ACAATTGAT	840
GATCGAGGGC ATCCGCCGGT CCGGCGCCGA GCGCTTCATC TTCCACCACA ACGATCCCGT	900
CCATCTGGAC CGGTTGCTTT CGTCCGTCGA TCCGGCGCGC CCGAAGATCG TGGCCTTCGA	960
AAGCGTCTAC AGCATGGACG GCGACATCGC CCCCATCGCC GAAATCTGCG ACGTGGCCGA	1020

GCGGCATGGT GCGCTGACCT ATCTCGACGA GGTTCATGCG GTCGGACTTT ACGGCCCCGCG 1080
 CGGCGGCGGC ATCAGCGACC GCGACGGGTT GGCGGATCGG GTGACGATCA TCGAGGGCAC 1140
 GCTCGCCAAG GCTTTCGGCG TGATGGGCGG CTATGTCAGC GGCCCGTCCC TGCTGATGGA 1200
 TGTGATCCGC AGCATGTCCG ACAGTTTCAT CTTACACCACC TCGATCTGCC CGCACCTCGC 1260
 GGCGGGGGCC CTCGCGGCGG TCCGGCATGT GAAGGCTCAT CCCGACGAGC GCCGCCGGCA 1320
 GGCGGAGAAT GCGGTGCGCC TCAAGGTCCT GCTGCAGAAG GCCGGTCTCC CGGTTCTCGA 1380
 CACGCCAGT CACATCCTTC CCGTGATGGT GGGCGAGGCG CATCTCTGCC GCAGCATCAG 1440
 CGAGGCGTTG CTCGCCCCGCC ACGCCATCTA CGTCCAGCCG ATCAACTATC CGACCGTGGC 1500
 TCGGGGGCAG GAGCGGTTTC GGCTGACGCC GACGCCCTTC CATAACGACGT CTCACATGGA 1560
 GGCACGTGTC GAGGCGCTCC TCGCCGTTGG CCGGGATCTC GGATGGGCCA TGTCGAGGCG 1620
 GGCTGCCTAG GCAGGAGCCA CCACCGGCTC TCGGTCCCGT GGCCGGCGCC TCGCGGGGAT 1680
 CGAAGCGCTC TCGCCCGCCG GCCATGCGCA ACGGACCCGG GTGCCGAAG ACACGCCATC 1740
 GGATCCGGCA AGGACGGCGT GTTCGTCGCG GAGGGCACCC GGACAGGCGC TCGGGGATCC 1800
 GGCGCCGTCA TCCTCTCGGC CGGAGAGATC GCCTTGATCC GGCATCCCCC GAAGCCGTGG 1860
 ACGCGCCGTG CCTGCCTGCA G 1881

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1320 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Rhodobacter capsulatus hemA

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..1320

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TGCGCGCCGG ACAGGGCCGA AGAGCCGACC CGGCAAACCA CAACCAGCAG CAAAGCCAGG 60
 GGTGACGCAC ATGGACTACA ATCTCGCGCT CGACAAAGCG ATCCAGAAAC TCCACGACGA 120
 GGGACGTTAC CGCACGTTCA TCGACATCGA ACGCGAGAAG GGCGCCTTCC CCAAGGCGCA 180

GTGGAACCGC CCCGATGGCG GCAAGCAGGA CATCACCGTC TGGTGCGGCA ACGACTATCT 240
GGGCATGGGC CAGCACCCGG TCGTTCTGGC CGCGATGCAT GAGGCGCTGG AAGCGGTCGG 300
GGCCGGTTTCG GGCGGCACCC GCAACATCTC GGGCACCACG GCCTATCACC GCCGTCTGGA 360
AGCCGAGATC GCCGATCTGC ACGGCAAGGA AGCGGCGCTT GTCTTCTCCT CGGCCTATAT 420
CGCCAATGAC GCGACGCTCT CGACGCTGCG GCTGCTTTTC CCCGGCCTGA TCATCTATTC 480
CGACAGCCTG AACCACGCCT CGATGATCGA GGGGATCAAG CGCAATGCCG GGCCGAAGCG 540
GATCTTCCGT CACAATGACG TCGCCCATCT GCGCGAGCTG ATCGCCGCTG ATGATCCGGC 600
CGCGCCGAAG CTGATCGCCT TCGAATCGGT CTATTGATG GATGGCGACT TCGGCCCGAT 660
CAAGGAAATC TCGACATCG CCGATGAATT CGGCGCGCTG ACCTATATCG ACGAAGTCCA 720
TGCCGTCGGC ATGTATGGCC CCCGCGGCGC GGGCGTGGCC GAGCGTGACG GTCTGATGCA 780
CCGCATCGAC ATCTTCAACG GCACGCTGGC GAAAGCCTAT GGCGTCTTCG GCGGCTACAT 840
CGCCGCTTCG GCGAAGATGG TCGATGCCGT GCGCTCCTAT GCGCCGGGCT TCATCTTCTC 900
GACCTCGCTG CCGCCGGCGA TCGCCGCTGG CGCGCAGGCC TCGATCGCGT TTTTGAAAAC 960
CGCCGAAGGG CAGAAGCTGC GCGACGCGCA ACAGATGCAC GCGAAGGTGC TGAAATGCG 1020
GCTCAAGGCG CTGGGGATGC CGATCATCGA CCATGGCAGC CACATCGTTC CGGTGGTCAT 1080
CGGTGACCCC GTGCACACCA AGGCGGTGTC GGACATGCTC CTGTCGGATT ACGGCGTTTA 1140
CGTGCAGCCG ATCAACTTCC CGACGGTGCC GCGCGGCACC GAACGGCTGC GCTTCACCCC 1200
CTCGCCGGTG CATGACCTGA AACAGATCGA CGGGCTGGTT CATGCCATGG ATCTGCTCTG 1260
GGCGCGCTGT GCGTGAATCG CGCCGAGGCC TCTGCCTGAG CCATTCTGCG GATGCACCGC 1320

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2117 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Saccharomyces cerevisiae* HEM1

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..2117

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATACTCTATT	CGGTTGTGTG	TTGCACCCCTG	CTCTGTGTGC	TCTCAACCGT	TCTTCCTTTA	60
CACGCCTTCC	CTTCTCAGCT	CGCGTTTCTT	TTTTTTTTTAT	CCCACTCTTT	TCTTTTTTCT	120
TTCCTATATA	TTGCCCATAT	AAGTTTGGTT	GGAAGGAAAA	CTAATAGAGC	TAGTTGTTGT	180
CCCTCAATAA	TCATAACAGT	ACTTAGGTTT	TTTTTTCAGT	ATGCAACGCT	CCATTTTTGC	240
GAGGTTCCGT	AACTCCTCTG	CCGCTGTTTC	CACACTGAAT	AGGCTGTCCA	CGACAGCCGC	300
ACCACATGCG	AAAAATGGCT	ATGCCACCGC	TACTGGTGCT	GGTGCCGCTG	CTGCCACTGC	360
CACAGCGTCA	TCAACACATG	CAGCAGCAGC	AGCAGCCGCT	GCTGCCAACC	ATTCCACCCA	420
GGAGTCGGGT	TTCGATTACG	AAGGCCTGAT	AGATTCCGAA	CTGCAGAAGA	AAAGACTTGA	480
CAAATCGTAC	AGATATTTCA	ACAATATCAA	CCGATTGGCC	AAGGAGTTCC	CCCTAGCTCA	540
TCGCCAGAGA	GAGGCGGACA	AGGTCACCGT	TTGGTGTTCC	AACGACTATT	TAGCACTTTC	600
CAAGCACCCCT	GAGGTATTGG	ACGCCATGCA	TAAAACTATC	GACAAGTATG	GTTGTGGTGC	660
CGGTGGTACA	AGAAACATTG	CTGGCCATAA	CATCCCCACT	TTGAATCTGG	AAGCCGAATT	720
GGCCACTTTA	CACAAGAAGG	AAGGTGCCTT	AGTTTTTTTCG	TCATGTTACG	TAGCCAACGA	780
TGCCGTCTTA	TCCCTACTGG	GTCAAAGAT	GAAGGACTTG	GTGATTTTCT	CCGACGAACT	840
CAACCATGCG	TCCATGATTG	TCGGTATTAA	GCATGCTAAC	GTAAAAAAAC	ACATTTTCAA	900
ACATAATGAC	TTGAACGAAT	TGGAACAACT	GCTCCAGTCA	TACCCCAAAT	CCGTTCTTAA	960
ACTAATTGCT	TTCGAATCAG	TATATTCTAT	GGCCGGTTCA	GTGGCCGACA	TAGAAAAAAT	1020
TTGCGACTTG	GCCGACAAAT	ACGGTGCTTT	GACCTTCTTG	GATGAAGTAC	ATGCGGTCGG	1080
CCTGTACGGC	CCTCACGGTG	CAGGTGTTGC	AGAACATTGT	GATTTTGAAA	GTCACCGTGC	1140
AAGTGGTATT	GCTACCCCAA	AGACCAATGA	CAAGGGCGGC	GCGAAGACTG	TGATGGACCG	1200
TGTCGACATG	ATCACCGGCA	CTTTAGGTAA	GTCTTTCGGT	AGCGTAGGTG	GCTACGTCGC	1260
AGCCTCTAGG	AAATTGATCG	ATTGGTTCAG	ATCGTTTGCA	CCTGGTTTCA	TTTTACCCAC	1320
GACTTTACCA	CCTTCAGTTA	TGGCAGGCGC	TACCGCAGCA	ATTAGATACC	AACGTTGCCA	1380
CATCGACCTA	AGAACCTCGC	AACAGAAACA	TACCATGTAC	GTAAAGAAAG	CTTTCCATGA	1440
GTTGGGCATT	CCAGTTATTG	CAAATCCTTC	TCATATCGTC	CCAGTGTTGA	TTGGTAATGC	1500
TGATTTGGCT	AAGCAAGCTT	CTGACATCTT	AATCAATAAG	CATCAAATCT	ACGTACAAGC	1560

TATCAACTTC CCTACGGTTG CTCGCGGTAC CGAAAGATTG AGAATTACCC CAACGCCAGG 1620
 TCACACCAAC GATTTATCTG ACATCTTAAT CAATGCAGTT GATGATGTGT TCAATGAGCT 1680
 ACAGTTACCA CGTGTCAGAG ACTGGGAAAG CCAAGGTGGC TTATTGGGTG TTGGAGAGAG 1740
 CGGATTTGTG GAAGAGTCTA ACTTATGGAC ATCAAGCCAA CTATCTTTAA CTAATGACGA 1800
 CTTGAACCCT AATGTTAGAG ACCCCATCGT TAAACAATA GAGGTTTCTA GTGGTATCAA 1860
 GCAGTAAAC AACCAATATA TGCATGGGCT GAGATAGAGG TACAAGGAAT TTGTAAATCA 1920
 GTAAAAAAA AAATTAACAG TTTTTTTTTT TCATTTTTTT TTTTATTCTT ATTTATGTAT 1980
 GATACTTTAT TATTATTTCT CTTAATTATT TATTTATTTA ACTAACACGA TGAGCACTTT 2040
 TAACTGCAAT GGTAAACTG TAGCAATGTT GGTAAAAAAG CAGGGAAAGT TCAAAAATAA 2100
 TTTATGTATT TTTCCTC 2117

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2416 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Arabidopsis thaliana* gsa2

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..2416

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TGAAAAAGAA CATACTTTT CATAATCAAA TTATGATATA TTCTACCAA TTATAAGCAA 60
 AGGAAAATTA TAATCTAGTC ATTATTTATA CATGTTATAT TTGAATTCAC GTTTGTATCC 120
 ATTACAAAAA TTTATGTAAT TCGCAGAAAA TATATATATG TCAAATTAAG TTATCGGACC 180
 GGATCGGGTC AAAGAAACCG GATTGGTTAA CAAAGTCAA CAAACAAATA TTGACTTGAG 240
 TTTCAGATTC CAGTAAATC AAACCGGATC GGGTCTGAAT TTAAACCACC GGGTCGGCTC 300
 CATCTAAAT CTGAAGATCA TCTCCGCCCT ATCTTGTTGA CTATCTCTGT ACTACTTACG 360
 AGCGCAAGTG AGAGAGTAAC AGAGAAACGT AGAGATATAG CAAAATGGCT GCGACGCTTA 420

CTGGATCAGG GATTGCTCTA GGGTTTTTCGT CGTCCGCAAA GTTCTCTAAG AGAGCTTCTT 480
CGTCGTCCAA CCGTCGCTGC ATCAAGATGT CGGTTTCGGT AGAGGAGAAG ACGAAGAAAT 540
TCACTCTTCA GAAATCTGAG GAAGCTTTCA ATGCTGCGAA GGTTAGGCTT TTCAATTTCC 600
ATGAATTCAG TCAATAAGAA ATGTTTCTTC AGATTGATTA CGCCTTGATG TTCTGTTGCT 660
TTGGTTTTGT GGGATTTGAT CATATTTTTG GTTAAAGTGA TTATCTTTGT TACCCTTCAA 720
GGAACATTGC TAACAAAATA AGATTACTTG AGATAGAATC ATAATCTGAG ATAAAGTTTT 780
TGTTTTTATT CGGTTTCATT CTGTTCTGAT TATTGAAATT GGTTCGGTTC CTTTGTGTAG 840
AACTTAATGC CTGGAGGTGT GAACTCACCT GTACGTGCTT TCAAATCTGT TGGTGACAA 900
CCAGTGGTGA TGGATTCTGC AAAGGGCTCA CGAATAAGAG ACATTGATGG AAATGAATAC 960
ATTGACTATG TTGGATCTTG GGGACCTGCT ATAATTGGTC ATGCTGATGA TGAGGTTTGT 1020
TTCTTTCCAG TTTTGATGAT TTTTAGATAG CTGAAAGTTT AGTAGTTGAT ACGGTGATGT 1080
GTCTAGTGCA GGTCTTGCT GCTTTGGCTG AGACAATGAA GAAAGGAACA AGCTTTGGTG 1140
CTCCTTGTCT CTTAGAGAAT GTTCTTGCTG AGATGGTGAT TTCAGCTGTT CCAAGTATTG 1200
AAATGGTTCG GTTTGTTAAC TCCGGTACAG AGGCATGTAT GGGTGTGCTA CGTCTTGCTC 1260
GTGCCCTTCAC AGGGAAACAA AAGTTCATCA AGTTTGAAGG TTGTTATCAT GGTCATGCAA 1320
AATCTTTCCT TGTCAAAGCA GGTAGTGGTG TAGCTACTTT GGGTCTACCT GACTCGCCTG 1380
GGGTCCCCAA AGCAGCTACT TCAGATACTT TAACAGCTCC ATACAATGAT ATTGCTGCTG 1440
TTGAGAAGCT TTTTGAGGCA AACAAAGGAG AGATTGCTGC CATCATTCTT GAACCTGTTG 1500
TTGGTAACTC GGGTTTTTATT ACACCTAAAC CAGAGTTCAT TGAGGGAATA CGCCGGATCA 1560
CTAAAGACAA TGGTGCTCTT CTTATTTTGG ATGAAGTCAT GACTGGTTTT CGTTTAGCCT 1620
ATGGTGGAGC TCAAGAGTAC TTTGGAATCA CACCTGACTT AACAACTCTT GGGAAAATCA 1680
TCGGTGGTGG TCTTCCTGTG GGAGCATACG GTGGAAGAAG AGACATCATG GAAATGGTAA 1740
AGCTAGAGTT GTTAACAATT GAACCGAATA ATCTTTTGAA TTTGCTGCAA GAGATTGAGA 1800
AAGTCCTGAT CCTTTATCAC TCATGTCTTT TTGCAGGTTG CACCCGCAGG ACCGATGTAT 1860
CAAGCTGGTA CGCTAAGTGG TAATCCGTTG GCTATGACAG CGGGTATACA CACGCTGAAG 1920
CGGTAAAGTC AGCCAGGGAC ATATGAATAC TTAGACAAGA TCACAAAAGA GCTTACAAAT 1980
GGGATACTAG AAGCCGGGAA GAAAACCGGG CATGCGATGT GTGGCGGTTA CATAAGCGGG 2040
ATGTTTCGGTT TCTTCTTCAC GGAAGGACCC GTCTATGATT TCTCGGATGC AAAGAAGAGT 2100
GATACAGAGA AGTTTGAAA GTTTTTCAGA GGAATGTTGG AAGAAGGTGT CTAATTGGCA 2160

CCTTCTCAAT TCGAGGCCGG TTTTACTAGC TTGGCTCACA CTCAGAAGA CATCCAATC 2220
ACTATCGCAG CGGCCGAGAA GGTTCTAAGT CGGCTCTAAA ATGTCTCTGG AAGCTTCCAG 2280
GGAACCATGA ATGTATTTGA AATATTTTGA TGTAAGAGAAA ATTAGATTCA ATTGAGAGCA 2340
AGCAAGCAAT CTCACAAAAT TTAAGTGTGG TAAGAAAAGT CAAAATGTCT ATGAAGATT 2400
GTTGACTTTT TAAAAA 2416

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1620 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Gerste GSA

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..1620

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GAGAAGGAAG GCAGCATCAT GGCCGGAGCA GCAGCCGCCG TGGCCTCCGG CATATCGATC 60
AGGCCTGTAG CCGCGCCTAA GATCTCGCGC GCGCCCCGCT CTCGGTCGGT GGTGAGGGCG 120
GCCGTCTCCA TAGACGAGAA GGCTTACACG GTTCAGAAAT CCGAGGAGAT CTTCAACGCC 180
GCCAAGGAAT TGATGCCTGG TGGTGTTAAT TCACCAGTCC GTGCCTTCAA ATCAGTCGGC 240
GGGCAGCCCA TAGTTTTTGA TTCTGTGAAG GGCTCTCATA TGTGGGATGT CGATGGAAAT 300
GAATATATTG ATTATGTTGG TTCCTGGGGT CCTGCAATCA TTGGTCATGC AGATGACAAG 360
GTGAATGCTG CACTTATTGA AACTCTGAAG AAGGGTACTA GCTTTGGTGC TCCATGTGCG 420
TTGGAGAATG TGTGGCTCA AATGGTCATC TCCGCTGTGC CGAGTATCGA AATGGTTCGT 480
TTTGTA AATT CAGGAACAGA AGCTTGCATG GGAGCACTCC GCCTTGTCG TGCATTCACT 540
GGGAGGGAAA AGATTCTCAA GTTTGAAGGC TGTTACCATG GCCATGCAGA TTCCTTCCTT 600
GTTAAAGCAG GCAGTGGTGT TGCCACCCTC GGCCTCCCAG ACTCCCCTGG AGTGCCTAAG 660
GGAGCCACCG TTGGGACTCT AACAGCACCT TATAATGATG CTGATGCGGT TAAAAAGCTG 720
TTTGAGGATA ACAAAGGGGA GATTGCTGCA GTCTTCCTTG AGCCGGTTGT TGGCAATGCT 780

GGCTTCATTC CTCCGCAGCC TGCTTTCCTA AATGCTCTCC GTGAGGTGAC CAAACAAGAC 840
GGTGCACTTC TGGTGTTTGA TGAAGTGATG ACTGGTTTCC GTTTAGCTTA TGGTGGGGCA 900
CAAGAGTACT TTGGAATCAC CCCTGATGTG ACAACCTTGG GGAAAATTAT TGGCGGTGGT 960
CTTCCGGTTG GTGCTTACGG TGGACGGAAG GATATCATGG AGATGGTTGC TCCAGCAGGG 1020
CCAATGTACC AGGCAGGAAC CCTCAGTGGA AACCCTCTAG CTATGACTGC TGGAAATCCAC 1080

ACTCTCAAGC GTCTGATGGA GCCTGGCACC TATGAATACT TAGACAAGGT CACTGGTGAA 1140
CTTGTCCGGG GCATATTGGA TGTGGGCGCT AAAACAGGGC ACGAGATGTG TGGAGGACAC 1200
ATCAGAGGCA TGTTCCGATT CTTCTTCGCA GGTGGCCCAG TGCACAACTT TGATGATGCC 1260
AAGAAGAGTG ACACAGCGAA GTTTGGGAGG TTCCACCGTG GAATGCTGGG CGAAGGCGTG 1320
TATCTGGCAC CATCCAGTT CGAGGCAGGT TTTACAAGCT TGGCACACAC CACCCAAGAC 1380
ATTGAGAAAA CCGTGGAGGC TGCCGAGAAG GTTCTTCGAT GGATATAGAT GATTTGGATT 1440
GCAAACCTTT TGAAGCTTTT CCTTCTGTTG TATTCTGTTA GTTTGTACGT GGCTGAAGTT 1500
TAGTTTTGTA TTGTATTTTG TTGTGCAGCA GCAGTATCTT GTCTCTAGCC CATTTTTCTT 1560
CTTCTGAGTT AGCATTTGGG GTGATTTTGT CTTGGCAATA AACTTTGGC TACGACCTCC 1620

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1224 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..1224

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CAGGACTACA ATCTGGCACT CGATACCGCT CTGAACCGGC TCCATACCGA GGGCCGGTAC 60
CGGACCTTCA TCGACATCGA GCGGCGCAAG GGTGCCTTCC CGAAAGCCAT GTGGCGCAAG 120
CCCCACGGGA GCGAGAAGGA AATCACCGTC TGGTGGGCA ACGACTATCT CGGCATGGGT 180
CAGCATCCGG TGGTGCTGGG GGCCATGCAC GAGGCGCTGG ATTCGACCGG CGCCGGGTCTG 240

```

GGCGGCACGC GCAACATCTC GGGCACCACG CTCTATCACA AGCGCCTCGA GGCCGAGCTC      300
GCCGACCTGC ACGGCAAGGA ATCGGCGCTG GTCTTCTCTT CGGCCTATAT CGCCAACGAC      360
GCGACCCTCT CGACGCTGCC GCAGCTGATC CCGGGCCTCG TCATCGTCTC GGACAAGTTG      420
AACCACGCTT CGATGATCGA GGGCATCCGC CGCTCGGGCA CCGAGAAGCA CATCTTCAAG      480
CACAATGACC TCGACGACCT GCGCCGGATC CTGACCTCGA TCGGCAAGGA CCGTCCGATC      540
CTCGTGGCCT TCGAGTCCGT CTATTCGATG GATGGCGACT TCGGCCGCAT CAAGGAAATC      600
TGCGACATCG CCGACGAGTT CGGCGCGCTG AAATACATCG ACGAGGTCCA TGCCGTCGGC      660
ATGTACGGCC CCCGCGGCGG CGGCGTGGCC GAGCGGGACG GGCTGATGGA CCGGATCGAC      720
ATCATCAACG GGACGCTGGG CAAGGCCTAT GCGGTGTTCG GCGGCTATAT CGCGGCCTCG      780
GCCAAGATGT GCGACGCGGT GCGATCCTAC GCGCCGGGCT TCATCTTCTC GACCTCGCTG      840
CCGCCCCTCG TGGCGGCCCG TGCGGCGGCC TCGGTGCGCC ACCTCAAGGG CGATGTGGAG      900
CTGCGCGAGA AGCACCAGAC CCAGGCCCGC ATCCTGAAGA TCGGCCTCAA GGGGCTCGGC      960
CTGCCGATCA TCGACCACGG CTCGCACATC GTGCCGGTCC ATGTGGGCGA CCCCCTGCAC     1020
TGCAAGATGA TCTCGGACAT GCTGCTCGAA CATTTGGGCA TCTATGTCCA GCCGATCAAC     1080
TTCCCCACGG TGCCGCGCGG GACCGAACGG CTGCGCTTCA CGCCGTCGCC CGTGCAATGAT     1140
TCCGGCATGA TCGACCATCT CGTGAAGGCC ATGGATGTGC TCTGGCAGCA CTGTGCGCTG     1200
AATCGCGCCG AGGTCGTTGC CTGA                                             1224

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4796 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..4796

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

```

TCGCGCGTTT CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGTCCCCG GAGACGGTCA      60
CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCC TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG      120
TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC      180
ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC      240

```

DATE: 10/10/2010

TTGACTATGC	TGCTGCTGCA	ACTGCCGCAT	ATCGGCCAGG	TTCAGTGTGG	AGTATGGCCA	2160
GCTGCTGTTC	GCGAGAGCGT	CCCTTCTCTG	CTGTAATAAT	TTATCGCCGC	CAGCGTCTGA	2220
GCAGGCGCTT	CGCATCCCCG	TATCAAAGCG	CCAGATATGA	TCGAAAATGC	GCATGATGCC	2280
GGGTTTGCCG	TGTGCCGACA	TCGCCACGGC	ATGAAAGCGA	TGCTGATGTA	CCCGCTGCAG	2340
GCATGCCGCT	GAAATCACCA	GTCTCTCTCT	ACAAATCTAT	CTCTCTCTAT	AATAATGTGT	2400
GAGTAGTTCC	CAGATAAGGG	AATTAGGGTT	CTTATAGGGT	TTCGCTCATG	TGTTGAGCAT	2460
ATAAGAAACC	CTTAGTATGT	ATTTGTATTT	GTAAATACT	TCTATCAATA	AAATTTCTAA	2520
TTCCTAAAC	CAAAATCCAG	TGGCGAGCTC	GAATTCAAGC	TTGGCGTAAT	CATGGTCATA	2580
GCTGTTTCCT	GTGTGAAATT	GTTATCCGCT	CACAATCCA	CACAACATAC	GAGCCGGAAG	2640
CATAAAGTGT	AAAGCCTGGG	GTGCCTAATG	AGTGAGCTAA	CTCACATTAA	TTGCGTTGCG	2700
CTCACTGCCC	GCTTTCAGT	CGGGAAACCT	GTCGTGCCAG	CTGCATTAAT	GAATCGGCCA	2760
ACGCGCGGGG	AGAGGCGGTT	TGCGTATTGG	GCGCTCTTCC	GCTTCCTCGC	TCACTGACTC	2820
GCTGCGCTCG	GTCGTTCCGC	TGCGGCGAGC	GGTATCAGCT	CACTCAAAGG	CGGTAATACG	2880
GTTATCCACA	GAATCAGGGG	ATAACGCAGG	AAAGAACATG	TGAGCAAAAG	GCCAGCAAAA	2940
GGCCAGGAAC	CGTAAAAAGG	CCGCGTTGCT	GGCGTTTTTC	CATAGGCTCC	GCCCCCTGA	3000
CGAGCATCAC	AAAAATCGAC	GCTCAAGTCA	GAGGTGGCGA	AACCCGACAG	GACTATAAAG	3060
ATACCAGGCG	TTTCCCCCTG	GAAGCTCCCT	CGTGCGCTCT	CCTGTTCCGA	CCCTGCCGCT	3120
TACCGGATAC	CTGTCCGCCT	TTCTCCCTTC	GGGAAGCGTG	GCGCTTTCTC	AATGCTCACG	3180
CTGTAGGTAT	CTCAGTTCGG	TGTAGGTCGT	TCGCTCCAAG	CTGGGCTGTG	TGCACGAACC	3240
CCCCGTTTCA	CCCGACCGCT	GCGCCTTATC	CGGTAAGTAT	CGTCTTGAGT	CCAACCCGGT	3300
AAGACACGAC	TTATCGCCAC	TGGCAGCAGC	CACTGGTAAC	AGGATTAGCA	GAGCGAGGTA	3360
TGTAGGCGGT	GCTACAGAGT	TCTTGAAGTG	GTGGCCTAAC	TACGGCTACA	CTAGAAGGAC	3420
AGTATTTGGT	ATCTGCGCTC	TGCTGAAGCC	AGTTACCTTC	GGAAAAAGAG	TTGGTAGCTC	3480
TTGATCCGGC	AAACAAACCA	CCGCTGGTAG	CGGTGGTTTT	TTTGTGGLA	AGCAGCAGAT	3540
TACGCGCAGA	AAAAAAGGAT	CTCAAGAAGA	TCCTTTGATC	TTTTCTACGG	GGTCTGACGC	3600
TCAGTGGAAC	GAAAACTCAC	GTTAAGGGAT	TTTGGTCATG	AGATTATCAA	AAAGGATCTT	3660
CACCTAGATC	CTTTTAAATT	AAAAATGAAG	TTTTAAATCA	ATCTAAAGTA	TATATGAGTA	3720
AACTTGCTCT	GACAGTTACC	AATGCTTAAT	CAGTGAGGCA	CCTATCTCAG	CGATCTGTCT	3780
ATTCGTTTCA	TCCATAGTTG	CCTGACTCCC	CGTCGTGTAG	ATAACTACGA	TACGGGAGGG	3840
CTTACCATCT	GGCCCCAGTG	CTGCAATGAT	ACCGCGAGAC	CCACGCTCAC	CGGCTCCAGA	3900
TTTATCAGCA	ATAAACAGC	CAGCCGGAAG	GGCCGAGCGC	AGAAGTGGTC	CTGCAACTTT	3960
ATCCGCCTCC	ATCCAGTCTA	TTAATTGTTG	CCGGGAAGCT	AGAGTAAGTA	GTTCGCCAGT	4020

TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT	4080
TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTCCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT	4140
GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC	4200
CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC	4260
CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT	4320
GCGGCGACCG AGTTGCTCTT GCGGCGGTC AATACGGGAT AATACGCGC CACATAGCAG	4380
AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAACTCT CAAGGATCTT	4440
ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC	4500
TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA	4560
GGGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTT AATATTATTG	4620
AAGCATTTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA	4680
TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC	4740
CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTCGTC	4796

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4186 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..4186

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA	60
CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG	120
TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC	180
ACCATACCTG CACGGCGGCC GCGCTGGTGG CAGGATATAT TGTGGTGTA ACAAATTCCT	240
GCAGGCAATT CACTGGATTT TGGTTTTAGG AATTAGAAAT TTTATTGATA GAAGTATTTT	300
ACAAATACAA ATACATACTA AGGGTTTCTT ATATGCTCAA CACATGAGCG AAACCCTATA	360
AGAACCCTAA TTCCCTTATC TGGGAACCTAC TCACACATTA TTATAGAGAG AGATAGATTT	420
GTAGAGAGAG ACTGGTGATT TCAGCGTCAG ATCTGGGTAA CTGGCCTAAC TGGCCTTGGA	480
GGAGCTGGCA ACTCAAAATC CCTTTGCCAA AAACCAACAT CATGCCATCC ACCATGCTTG	540

TATCCAGCTG CGCGCAATGT ACCCCGGGCT GTGTATCCCA AAGCCTCATG CAACCTAACA	600
GATGGATCGT TTGGAAGGCC TATAACAGCA ACCACAGACT TAAAACCTTG CGCCTCCATA	660
GACTTAAGCA AATGTGTGTA CAATGTGGAT CCTAGGCCCA ACCTTTGATG CCTATGTGAC	720
ACGTAAACAG TACTCTCAAC TGTCCAATCG TAAGCGTTCC TAGCCTTCCA GGGCCCAGCG	780
TAAGCAATAC CAGCCACAAC ACCCTCAACC TCAGCAACCA ACCAAGGGTA TCTATCTTGC	840
AACCTCTCTA GATCATCAAT CCACTCTTGT GGTGTTTGTG GCTCTGTCCT AAAGTTCACT	900
GTAGACGTCT CAATGTAATG GTTAACGATA TCACAAACCG CGGCCATATC AGCTGCTGTA	960
GCTGGCCTAA TCTCAACTGG TCTCCTCTCC GGAGACATGG TGGATCCCCG GCCTGTCCTC	1020
TCCAAATGAA ATGAACCTTC TTATATAGAG GAAGGGTCTT GCGAAGGATA GTGGGATTGT	1080
GCGTCATCCC TTACGTCAGT GGAGATATCA CATCAATCCA CTTGCTTTGA AGACGTGGTT	1140
GGAACGTCTT CTTTTTCCAC GATGCTCCTC GTGGGTGGGG GTCCATCTTT GGGACCACTG	1200
TCGGCAGAGG CATCTTCAAC GATGGCCTTT CCTTTATCGC AATGATGGCA TTTGTAGGAG	1260
CCACCTTCCT TTTCCACTAT CTTCAACAATA AAGTGACAGA TAGCTGGGCA ATGGAATCCG	1320
AGGAGGTTTC CGGATATTAC CCTTTGTGTA AAAGTCTCAA TTGCCCTTTG GTCTTCTGAG	1380
ACTGTATCTT TGATATTTTT GGAGTAGACA AGCGTGTCGT GCTCCACCAT GTTGACGAAG	1440
ATTTTCTTCT TGTCATTGAG TCGTAAGAGA CTCTGTATGA ACTGTTGCGC AGTCTTTACG	1500
GCGAGTTCTG TTAGGTCTTC TATTTGAATC TTTGACTCCA TGGGAATTGG TACCTACGTA	1560
TGCATGGCGC GCCATATGCC CGGGCCCTGT ACAGCGGCCG GCCGCGTTAA CGCGTATACT	1620
CTAGAGCGAT CGCAGGCTTG CTTTTCCATT ATTTTGCGCA ACAAGTCACG GATATTCGTG	1680
AAAACGACAA AACTGCGAA ATTTGCGGGC AGTGCCTTCA GTTTTCCTAT TAATATTTAG	1740
TTTGACACCA GTTGCTATCA TTGCGGCCAA GCTCAGGATC AGATTGTCGT TTCCGCGCTT	1800
CGGTTTAAAC TATCAGTGTT TGACAGGATA TATTGGCGGG TAAACCTAAG AGAAAAGAGC	1860
GTTTATTAGA ATAATCGGAT ATTTAAAAGG GCGTGAAAAG GTTTATCCGT TCGTCCATTT	1920
GSTATGTCAT GCAAGCTAGC GGCCGCTAGC TTGGCGTAAT CATGGTCATA GCTGTTTCCT	1980
GTGTGAAATT GTTATCCGCT CACAATTCCA CACAACATAC GAGCCGGAAG CATAAAGTGT	2040
AAAGCCTGGG GTGCCTAATG AGTGAGCTAA CTCACATTAA TTGCGTTGCG CTCACTGCCC	2100
GCTTTCCAGT CGGGAAACCT GTCGTGCCAG CTGCATTAAT GAATCGGCCA ACGCGCGGGG	2160
AGAGGCGGTT TGCCTATTGG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG	2220
GTCGTTCCGGC TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA	2280
GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC	2340
CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC	2400

AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG	2460
TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCGTGTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC	2520
CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTTCTC AAAGCTCACG CTGTAGGTAT	2580
CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCCCCTTCAG	2640
CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATC CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC	2700
TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT	2760
GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGAAC AGTATTTGGT	2820
ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC	2880
AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA	2940
AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGAAC	3000
GAAAACTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC	3060
CTTTTAAATT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT	3120
GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTGCTTCA	3180
TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACCTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT	3240
GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA	3300
ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC	3360
ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG	3420
CGCAACGTTG TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT	3480
TCATTAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCAT GTTGTGCAAA	3540
AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA	3600
TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC	3660
TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGAT GCGGCGACCG	3720
AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AATACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA	3780
GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG	3840
AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTAGCATC TTTTACTTTC	3900
ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG	3960
GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT	4020
CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA	4080
GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC	4140
ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTCGTC	4186

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 February 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/09304 A3

(51) International Patent Classification⁷: **C12N 15/53**,
15/61, 9/02, 9/90, 7/01, A61K 31/713, 38/43, C12Q 1/26,
1/533

(74) Agent: **RIZZO, Thomas, M.**; E.I. Du Pont de Nemours
and Company, Legal Patent Records Center, 1007 Market
Street, Wilmington, DE 19898 (US).

(21) International Application Number: **PCT/US00/21008**

(22) International Filing Date: **28 July 2000 (28.07.2000)**

(25) Filing Language: **English**

(26) Publication Language: **English**

(30) Priority Data:
60/146,600 **30 July 1999 (30.07.1999)** **US**

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **E.I. DU
PONT DE NEMOURS AND COMPANY** [US/US]; 1007
Market Street, Wilmington, DE 19898 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO,
RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **CAHOON, Re-
becca, E.** [US/US]; 2331 West 18th Street, Wilmington,
DE 19806 (US). **GUTTERIDGE, Steven** [US/US]; 4
Austin Road, Wilmington, DE 19810 (US). **HARVELL,
Leslie, T.** [US/US]; 103 Edward Lee Court, Newark,
DE 19713 (US). **RAFALSKI, J., Antoni** [US/US]; 2028
Longcome Drive, Wilmington, DE 19810 (US). **TAO,
Yong** [CN/US]; 101-8 Thorn Lane, Newark, DE 19711
(US). **WENG, Zude** [CN/US]; Apartment 301, 495 Leslie
Court, Des Plaines, IL 60016 (US).

Published:

— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
15 November 2001

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 01/09304 A3

(54) Title: **POLYNUCLEOTIDES ENCODING AMINOLEVULINIC ACID BIOSYNTHETIC ENZYMES**

(57) Abstract: This invention relates to an isolated nucleic acid fragment encoding an aminolevulinic acid biosynthetic enzyme. The invention also relates to the construction of a chimeric gene encoding all or a portion of the aminolevulinic acid biosynthetic enzyme, in sense or antisense orientation, wherein expression of the chimeric gene results in production of altered levels of the aminolevulinic acid biosynthetic enzyme in a transformed host cell.

3

4

by  and postFrom the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT RECEIVED

To:

RIZZO, Thomas M.
E.I. DUPONT DE NEMOURS AND COMPANY
Legal Patent Records Center
1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19805
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF 03 31 2001
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT PATENT RECORDS
(PCT Rule 71.1) CENTER

FAX NO: (302) 773-0164

Date of mailing
(day/month/year) 05.11.2001

Applicant's or agent's file reference
BB1373 PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US00/21008

International filing date (day/month/year)
28/07/2000

Priority date (day/month/year)
30/07/1999

Applicant
E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

REY NOTED

Name and mailing address of the IPEA/

 European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized officer

Büchler, S

Tel. +49 89 2399-8090



30 JA 2002

ID AB011416 standard; PLN; 1703 BP.

XX
AC AB011416;XX
SV AB011416.1XX
DT 02-MAR-1998 (Rel. 54, Created)

DT 14-JUL-1998 (Rel. 56, Last updated, Version 3)

XX
DE Oryza sativa mRNA for glutamyl-tRNA reductase, complete cds.XX
KW glutamyl-tRNA reductase.XX
OS Oryza sativa

OC Eukaryota; Viridiplantae; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta;

OC Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; Ehrhartoideae; Oryzeae; Oryza.

XX
RN [1]

RP 1-1703

RA Nakayashiki T.;

RT ;

RL Submitted (23-FEB-1998) to the EMBL/GenBank/DBJ databases.

RL Toru Nakayashiki, Graduate School of Science, Kyoto University, Department

RL of Biophysics, Sakyo-ku, Kitashirakawa, Oiwakechou, Kyoto 606-8502, Japan

RL (E-mail:nakkun@molbio.biophys.kyoto-u.ac.jp, Tel:075-753-4201)

XX
RN [2]

RA Takahashi S., Hirose T., Imaizumi N., Ohsugi R.;

RT "Cloning of a cDNA encoding plastidic fructose-1,6-bisphosphatase from rice

RT (Oryza sativa L.) (Accession No. AB007194) (PGR 98-083)";

RL Plant Physiol. 117:332-332(1998).

XX
DR AGDR; AB011416; AB011416.

DR MENDEL; 20321; Oryza;1136;20321.

DR SWISS-PROT; 048674; HEM1_ORYSA.

XX

FH Key Location/Qualifiers

FH

FT source 1..1703

FT /db_xref="taxon:4530"

FT /sequenced_mol="cDNA to mRNA"

FT /organism="Oryza sativa"

FT /dev_stage="5-day-old"

FT /strain="IR36"

FT /sub_species="L. indica"

FT CDS 72..1682

FT /codon_start=1

FT /db_xref="SWISS-PROT:048674"

FT /product="glutamyl-tRNA reductase"

FT /protein_id="BAA25003.1"

FT /translation="MMASTTSATAAGGAFAAAKTRRVVGGGRRPCARVAAGGRRRSQVV

FT VRCDAGVEAQAQAQAVAKAASVAALEQFKISADRYMKERSSSIAVIGLSVHTAPVEMREK

FT LAVAEELWPRAISELTSLNHIEEAVALSTCNRMEIYVVALSWNRGLREVVDWMSKKSGI

FT PASELREHLFMLRDSATRHLFEVSAGLDSLVLGEGEILAQVKQVVRSGQNSGGLGKNI

FT DRMFKDAITAGKRVRCETNISSGAVSVSSAAVELALMKLPKSECLSARMLLIGAGKMGK

FT LVVKHLIAKGCKKVVVNRSEVERVDAIREEMKDIEIVYRPLTEMYEAAAEADVFTSTA

FT SETPLFTKEHAELPAISDAMGGVRLFVDISVPRNVSAVCSEVGHARVYNVDDLKEVVE

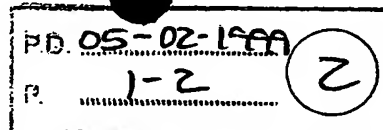
FT ANKEDRLRKAMEAQTIITQELKRFEAWRDSLETVPITIKLRSYADRIRASELEKCLQKI

FT GEDALTKKTRRSIEELSTGIVNKLHLGFLQHLRCDGSDSRILTDETLNMMHALNRMFSLD

FT TEKAIIEQKIKAKVERKSON"

XX

SQ Sequence 1703 BP; 416 A; 390 C; 538 G; 359 T; 0 other;



cattgatctg	gttttggttt	tgtgaggagg	agaagttgcg	gtggtgctgc	tgctggtgct	60
ttcttgatct	gatgatgc	agcacgacgt	cagcgacggc	cgccggg	gcgttcgcgcg	120
ccgcgaagac	gcggcggg	gtcggcggcg	ggcggcggcc	gtgcgcga	gtcgcgcgcg	180
gcgggcggag	gcggtccggc	gtggtggtgc	ggtgcgacgc	cgccgtggag	gcgcaggccc	240
aggcgcaggc	ggtggccaag	gccgccagcg	tcgccgcgct	cgagcagttc	aagatctccg	300
ccgaccggta	catgaaggaa	agaagtagca	tagcggtaat	aggcctcagt	gtacacactg	360
caccagtggg	gatgcgtgag	aaacttgctg	ttgcagagga	actatggccc	cgtgctatct	420
cagaactcac	cagtctgaat	catattgaag	aggctgctgt	tcttagtacc	tgcaatagaa	480
tggaaatcta	tgtggtagct	ttatcgtgga	accgtggact	tagagaagtg	gtagactgga	540
tgtcaaagaa	aagtggaatc	cctgcttctg	agctcaggga	gcctctattc	atgttgcggtg	600
acagtgatgc	cacacgccat	ctggttgagg	tatctgctgg	gcttgactct	ttggttcttg	660
gagaaggcga	aatccttgct	caagttaaac	aagttgtcag	aagtgggcaa	aacagtggag	720
gcttgggaaa	gaacatcgat	aggatgttca	aggatgcaat	cactgctgga	aagcgtgtcc	780
gctgcgagac	taacatatca	tcagggtgctg	tctctgtcag	ttcagctgca	gttgaattgg	840
ccttgatgaa	gcttccaaag	tcggaatgcc	tatctgctag	gatgctgttg	attggtgctg	900
gcaagatggg	aaagttggtg	gttaaacatt	tgattgccaa	gggatgcaag	aaagttggtg	960
tgggtgaaccg	ttcagtggaa	aggggtggatg	ccatccgcga	agagatgaaa	gacattgaga	1020
ttgtgtacag	gcctcttaca	gagatgtatg	aagccgctgc	cgaagctgat	gtcgtgttca	1080
caagcacggc	atccgaaacc	ccattgttca	caaaggagca	cgagaggcg	cttcccgccta	1140
tttctgatgc	tatgggtggt	gttcgactct	ttgtcgacat	atccgtcccc	agaaatytca	1200
gcgcctgtgt	gtctgaagtt	ggccatgcgc	gagtatacaa	cgtcgatgac	ttgaaagagg	1260
ttgtggaagc	caacaaggag	gaccggctta	ggaaagcaat	ggaggcccaa	acaatcatca	1320
cccaagaatt	gaaacggttc	gaggcatgga	gggactcgct	ggagaccgtt	ccgactatca	1380
agaagctgag	gtcctacgcc	gacaggatca	gggcttcgga	gcttgagaag	tgccctccaga	1440
agatcggcga	agacgccctc	accaagaaga	cgagaagatc	catcgaggag	ctcagcaccg	1500
gcacgtgaa	caagcttctc	cacggcccat	tgcagcacct	gagatgtgac	ggcagcgaca	1560
gccgcaccct	cgatgagacg	ctggagaaca	tgcacgccct	caacaggatg	ttcagcctcg	1620
acaccgagaa	ggcgatcatt	gagcagaaga	tcaaggcgaa	ggtggagaag	tcccagaact	1680
gagattgaag	aagagatttt	ccg				1703

//